

**DAS VERHALTEN DES INSULINREZEPTORS
AN ERYTHROZYTEN BEI TYP-II-DIABETIKERN UNTER
INSULINMONOTHERAPIE UND KOMBINATIONS-
BEHANDLUNG INSULIN/GLIBENCLAMID**

Dr. rer. nat. Caspar Sieger

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0028

Aus der III. Medizinischen Abteilung des Städtischen
Krankenhauses München - Schwabing und der Forschergruppe Diabetes
München

Vorstand: Prof. Dr. H. Mehnert

Prof. Dr. O. Wieland (em.)

DAS VERHALTEN DES INSULINREZEPTORS AN ERYTHROZYTEN
BEI TYP - II - DIABETIKERN UNTER INSULINMONOTHERAPIE
UND KOMBINATIONSBEHANDLUNG INSULIN / GLIBENCLAMID

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Caspar Sieger

aus

Ludwigsburg

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bachmann

Mitberichterstatter: 1) Prof. Dr. H. Mehnert

2) Prof. Dr. P. Schwandt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.2.1988

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Übersicht	1
I.1 Ziel der Studie	3
I.2 Patienten und Methoden	4
II. Insulinrezeptoren	7
II.1 Überblick über die bisherigen Arbeiten und Ergebnisse	7
II.2 Überblick über die bisherigen Arbeiten und Ergebnisse an Erythrozyten	12
III. Experimenteller Teil	16
III.1 Kurze Zusammenfassung der Fragestellung und der Durchführung	16
III.2 Entnahme der Blutproben	16
III.2.1 Präparation der Erythrozyten für die Bindungsstudien	19
III.2.2 Herstellung des Puffers	24
III.2.3 Durchführung der Bindungsstudien	25
III.2.4 Auswertung der Bindungsstudien	31
III.2.4.1 Die verwendeten statistischen Testverfahren zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse	44
IV. Die Meßwerte und Diskussion der für die einzelnen Gruppen erhaltenen Ergebnisse	47
IV.1 GRUPPE A (Klassische Therapie) Umstellung von Glibenclamid auf Insulin	48
IV.2 GRUPPE B Umstellung von Glibenclamid auf Insulin + Glibenclamid	65
IV.3 GRUPPE C Umstellung von der Insulinmonotherapie auf die Kombinationstherapie Insulin plus Glibenclamid	84
IV.4 Die Insulinbindung einer Normalgruppe zum quantitativen Vergleich	105

V. Vergleich der Gruppenergebnisse miteinander und Diskussion	109
V.1 Folgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit für eine mögliche Therapieempfehlung	115
VI. Fehlerabschätzung	116
VII. Die Rechenprogramme zur vollautomatischen graphischen Darstellung und Auswirkung der Bindungsdaten	122
Programm 1	122
Programm 2	128
Programm 3	133
Zusammenfassung der Arbeit	139
Literatur	143
Alphabetisches Verzeichnis der zitierten Autoren	163
Danksagung	167
Lebenslauf	168

I. EINLEITUNG UND ÜBERSICHT

Seit der Entdeckung und Einführung von Sulfonylharnstoffen in die Behandlung des Diabetes mellitus vor über 25 Jahren wird nach den Hauptwirkungsmechanismen ihres blutzuckersenkenden Effektes geforscht.

Bis vor wenigen Jahren wurde in einer ganzen Reihe von Arbeiten diese blutzuckersenkende Wirkung hauptsächlich oder sogar ausschließlich einer vermehrten Freisetzung von Insulin infolge einer direkten B-Zellen-Stimulation des Pankreas zugeschrieben (1-6).

Neuere Arbeiten hingegen zeigten, daß die chronische Verabreichung von Sulfonylharnstoffen sowohl im Tierversuch (7-10) als auch bei Menschen mit Typ II-Diabetes (=maturity onset, Altersdiabetes oder nicht-insulinpflichtiger Diabetes) zu einer signifikanten Abnahme der Insulinsekretion bei gleichbleibenden Blutglukosekonzentrationen führt. (11,19,20,37)

Da in gleicher Weise die Syntheserate von Proinsulin bei chronischer Gabe von Sulfonylharnstoffen abnimmt (12-15), die Sekretionsrate von Glucagon hingegen weder beim Gesunden noch bei Diabetikern beeinflußt zu werden scheint (16-18) - eine Abnahme der Glucagonsekretion bei Einnahme von Sulfonylharnstoffen könnte deren antidiabetische Wirkung erklären - müßte ihre Wirkung zumindest teilweise auf extrapankreatischen Mechanismen beruhen (19-21).

Der wichtigste dieser antidiabetischen Effekte einer chronischen Sulfonylharnstofftherapie (weitere werden in einem Übersichtsartikel von Lebowitz und Feinglos ausführlich diskutiert (11)) bei Typ-II -Diabetikern besteht in einer signifikanten Verstärkung der peripheren Wirkung einer definierten Insulinmenge. Diese läßt sich über die prozentuale Abnahme des Blutzuckers pro Minute bei Infusion einer bestimmten Insulindosis (=sogenannter K-Wert), also über die Änderung dK/dt (22-24) messen, wobei die unbekannte endogene Insulinsekretion mittels Epinephrin und Propranolol gehemmt wird. Ebenso zeigt sich diese Verstärkung der Insulinwirkung in der von vielen

Klinikern beschriebenen signifikanten Reduktion der von insulinpflichtigen Typ-II-Diabetikern benötigten Insulinmenge, wenn gleichzeitig Sulfonylharnstoffe gegeben werden (25-32).

Ein möglicher zentraler Mechanismus dieser Wirkungssteigerung von Insulin bei chronischer Sulfonylharnstofftherapie, der insgesamt in vielen Details noch unerforscht ist, wurde zuerst durch Olefsky und Reaven (33-35, 36, 37) gefunden. Sie konnten zeigen, daß bei den meisten Patienten mit nicht insulinpflichtigem Diabetes die Zahl der Insulinrezeptoren an den Erfolgsorganen deutlich verringert ist und daß sich unter einer Sulfonylharnstofftherapie diese erniedrigte Rezeptorzahl wieder vermehrt (38).

Da die an den Zelloberflächen lokalisierten Insulinrezeptoren der Ausgangspunkt einer intrazellulären Insulinwirkung sind (39-43), liegt es auf der Hand, daß eine Vermehrung der Insulinrezeptoren bzw. eine Veränderung ihrer Empfindlichkeit eine verstärkte Insulinwirkung in den Zellen zur Folge haben könnten (31). Diese Hypothese, die für andere Hormone als gesichert gelten kann (44, 45), wurde durch Messungen, die eine Korrelation zwischen der Anzahl der Insulinrezeptoren und der Insulinwirkung nachwiesen, bestätigt (46- 49).

Das Ziel jeder Diabetestherapie, eine normoglykämische Einstellung zu sichern, könnte demnach auch durch eine Erhöhung der Zahl der Insulinrezeptoren beim Typ II-Diabetes erreicht werden. Hierdurch würde dann die bei diesem Diabetestyp noch vorhandene Insulinsekretion, die ja oftmals im oder sogar über dem Normbereich liegt (37, 38, 50, 51) ausreichen, physiologische Blutzuckerkonzentrationen zu erzielen.

Natürlich kann dieses Ziel klinisch auch häufig durch die Zuführung entsprechend vieler Insulineinheiten erreicht werden.

Die Höhe des Insulinspiegels hat jedoch, wie in vielen Arbeiten nachgewiesen wurde (52-56), einen regulierenden Einfluß auf die Zahl der Insulinrezeptoren: Diese nehmen um bis zu 50% ab wenn

insbesondere der Basalwert des Seruminsulins ansteigt (36). Die daraus resultierende Insulinresistenz ist vielen Klinikern bei Typ-II-Diabetikern bekannt. In der Literatur (57) werden sogar Fälle beschrieben, bei denen trotz Gabe von 336 E/die Insulin der Blutzucker nicht unter 350 mg/100 ml fiel, ohne daß Insulinantikörper nachgewiesen werden konnten.

Wenn sich durch die Gabe von Sulfonylharnstoffen die Zahl der Insulinrezeptoren vermehren ließe (38), die durch die benötigten hohen Insulindosen verringert ist (52-56), dann wäre die gemeinsame Gabe von Insulin plus Sulfonylharnstoff bei insulinpflichtiger Typ-II-Diabetikern vorteilhaft. Durch eine solche Kombinationstherapie könnte eventuell Insulin eingespart und dadurch der Rückgang der Rezeptorzahl wie auch der noch vorhandenen Insulin-Eigenproduktion geringer gehalten werden. Hierdurch wäre vielleicht bei einigen Patienten eine voll befriedigende Diabeteseinstellung mit einer anstelle von 2 täglichen Insulininjektionen möglich (58).

I.1. ZIEL DER STUDIE

Obwohl es eine Reihe von Hinweisen und Hypothesen gibt, daß durch eine Insulin-Sulfonylharnstoff-Kombinationstherapie Insulin eingespart und damit sogar die Zahl der täglich benötigten Insulininjektionen reduziert werden kann (58), konnte sich bislang eine solche Kombinationstherapie nicht durchsetzen.

In dieser klinischen Studie soll an insulinpflichten Typ-II-Diabetiker untersucht werden, welchen Einfluß eine solche Kombinationstherapie mit möglichst geringen Insulindosen anstelle einer Insulinmonotherapie mit entsprechend höherer Dosis auf die Kohlehydrat-Stoffwechsellage hat. Parameter hierfür sind die nüchtern (8.00 Uhr) und postprandial (13.00 Uhr) gemessenen Blutzuckerwerte sowie die 24 h-Glukoseausscheidung. Außerdem sollen die in der Einleitung näher beschriebenen experimentellen Befunde überprüft werden, die eine negative Korrelation zwischen der Zahl der Insulinrezeptoren

und der täglich verabreichten Insulindosis ergeben. Hierzu sollte gemessen werden:

- 1) wie sich die Bindung von Insulin an seine spezifischen Rezeptoren unter der Therapie mit Insulin allein bzw. mit Insulin und zusätzlich Glibenclamid verhält;
- 2) ob sich unter einer Kombinationstherapie im Vergleich zu einer Insulinmonotherapie die Zahl der Insulinrezeptoren und/oder ihre Affinität ändert;
- 3) ob die beiden Therapiealternativen einen Einfluß auf die endogene Insulinproduktion - Parameter hierfür ist die C-Peptid Konzentration - haben;
- 4) ob unter der Kombinationstherapie infolge der geringeren Insulindosis die freien Plasmainsulinspiegel niedriger sind;

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen klären, ob und gegebenenfalls weshalb es unter einer Kombinationstherapie mit Insulin plus Sulfonylharnstoff im Vergleich zu einer üblichen Insulin-Monotherapie zu einer Verbesserung der Diabeteseinstellung kommt und ob sich eine solche Kombinationstherapie zumindest theoretisch empfehlen läßt.

I.2 PATIENTEN UND METHODEN

Um die im Abschnitt Einleitung angeführten Hypothesen experimentell zu überprüfen, wurden

- 1) 20 Typ II-Diabetiker, die in das Städtische Krankenhaus München-Schwabing eingewiesen wurden, weil die bisherige Therapie mit maximalen Glibenclamiddosen von 15 mg/ die und Diät nicht mehr ausreichte (=Sekundärversagen der Sulfonylharnstofftherapie) per Zufallsentscheid in 2 Gruppen aufgeteilt:

Gruppe A: wurde auf Insulin allein umgestellt, erhielt also die heute nach Sekundärversagen übliche Insulin-Monotherapie;

Gruppe B: behielt die vorangegangene Glibenclamidtherapie bei; zusätzlich wurde eine möglichst geringe Insulindosis verabreicht, bis eine befriedigende Einstellung erreicht wurde.

- 2) 9 Typ-II-Diabetiker, die bereits für mindestens 12 Monate eine hochdosierte Insulintherapie (durchschnittlich 91 E/ die) erhielten, ohne daß damit befriedigende Blutzuckerspiegel zu erzielen gewesen wären und deren Diabetesanamnesen wie auch deren klinischen Parameter mit denen der Gruppen A und B vergleichbar waren, einer Gruppe C zugeordnet. Diese Gruppe C wurde nun auf die Kombinationstherapie Insulin/Glibenclamid umgestellt mit dem Ziel, die bei hohen Insulinspiegeln erniedrigte Zahl der Insulinrezeptoren zu erhöhen um dadurch die bestehende Insulinresistenz zu verringern.

Auf eine spezielle Reduktionsdiät wurde bei allen Patienten verzichtet, obwohl diese im Durchschnitt 22,7% Übergewicht hatten. Dies war nötig, da eine Gewichtsreduktion allein schon eine Verbesserung der Stoffwechsellage (59-61) sowie eine Änderung der Insulinbindung zur Folge haben könnte (52, 54, 62-67).

Um Anhaltswerte dafür zu gewinnen wie sich die Insulinbindung bei Nicht-Diabetikern verhält, wurde zusätzlich ein Normalkollektiv untersucht (siehe auch 71, 187). Diese stoffwechselgesunden Probanden konnten allerdings nicht stationär aufgenommen werden; sie unterschieden sich auch im Alter und im Gewicht von den Gruppen A bis C.

Der verwendete Insulin-Rezeptorassay wird ausführlich im Kapitel III beschrieben. Dort werden auch die in dieser Arbeit angewandten graphischen Auswerteverfahren diskutiert. Die wichtigsten Angaben über die benutzten Chemikalien und Geräte finden sich in der folgenden Zusammenfassung sowie an den entsprechenden Stellen des Kapitel III.:



CHEMIKALIEN:

Hepes	Fa. Sigma Chemical	Nr. 43375
Tris	Fa. Merck	Nr. 8382
EDTA III	Fa. Merck	Nr. 8418
Phthalsäure-		
dibutylester	Fa. Merck	Nr. 800919
Humanserumalbu-		
min, reinst	Behringwerke	
Ficoll Paque	Fa. Pharmacia Chemical	

GERÄTE:

Venoject System zur Blutentnahme mit 143 USP Heparin/10 ml
Greiner PS Röhrchen 26 ml Nr. 196101
Hettich Rotixa Zentrifuge
Eppendorf Zentrifuge
Cenco whirlmix
Coultercounter Modell D
Thermostat Haahe FJ
Brandt Dispensetten 0,1-0,5 ml
Digital pH -Meter Modell 4500, Fa. Beckmann Instruments
Gammacounter Modell 1195 der Fa. Searle, Zählrohrbeute 82%,
Nulleffekt ca. 25 cpm
Computer Hewlett Packard 9815 mit Plotter 9871 A

II. INSULINREZEPTOREN

II.1 Überblick über die bisherigen Arbeiten und Ergebnisse

Schon in den frühen 50'er Jahren stellten Levin und Mitarbeiter fest, noch ohne die Existenz von Hormonrezeptoren zu kennen oder zu vermuten (72), daß sich zumindest eine Wirkung von Insulin direkt an der Plasmamembran von Zellen abspielt: vermittels Insulin wird der Glucosetransport durch die Membran beschleunigt. Erst im Jahre 1966 konnte dann von Pastan et al. (73) gezeigt werden, daß eine intrazelluläre Insulinwirkung nur solange nachzuweisen war, wie sich das Hormon an einer Zellmembran befand. Cuatrecasas (74) gelang es, Insulin mit einem hochmolekularen, inerten Zellulose-Polymer zu verbinden, ohne daß es seine biologische Wirkung einbüßte. Damit war sichergestellt - wie er zumindest glaubte, denn spätere Autoren bezweifelten, ob sich das Insulin nicht doch aus seiner Bindung gelöst hätte (75-77) - daß das Hormon nicht in die Zelle eindringen konnte. Aus der dennoch gemessenen Wirkung wurde gefolgert, daß Insulin nicht in die Zelle eindringen muß, um seine Wirkung zu entfalten.

Der direkte Nachweis einer Hormonbindung wurde erst möglich, als es 1970 gelang, Polypeptidhormone mit hochradioaktiven Isotopen zu markieren, ohne ihre biologische Wirksamkeit dadurch zu beeinträchtigen (78-80). Hierdurch wurden systematische Untersuchungen nach der Spezifität solcher Bindungsstellen gegenüber verschiedenen Hormonanalogen möglich (79). Eine ausführliche Übersicht über die Arbeiten zu Beginn der Rezeptorforschung findet sich in einer Übersicht von Kahn (81).

Trotz der vielen seither unternommenen Untersuchungen an Insulinrezeptoren konnte für sie - im Gegensatz z.B. zu Glucagon, das sich unter bestimmten Bedingungen, wie Levey et al. zeigten (82), an eine lösliche Adenylatzyklase-Präparation aus dem Myokard von Katzen binden und sie aktivieren kann - kein sicherer Beweis eines direkten Effektes gefunden werden, wenn sich Insulin an einen löslichen Rezeptor bindet (49,83).

Der Begriff "Insulinrezeptor" wird deshalb schon dann verwendet, wenn die Bindung von Insulin in einem biologischen System eine Sättigung zeigt, die Bindung reversibel, spezifisch und kompetitiv hemmbar ist, und wenn es ausreichende indirekte Beweise dafür gibt, daß die Bindung biologische Wirkung auslöst. Wo für letztere keine Nachweise existieren, wie z.B. bei Erythrozyten, genügt, daß die Bindungsorte denen ähnlich sind, die in anderen Systemen nachweisbar Wirkungen von Hormonen oder ähnlichen Substanzen vermitteln. Das letzte Kriterium ist deshalb so besonders wichtig, weil Cuatrecasas und Hollerberg (84) an rezeptorfreiem Material (Silikaten, Talkum) Sättigung, Spezifität, hohe Affinität und Reversibilität nachweisen konnten.

Die Bindung von Insulin an solche spezifischen "Rezeptoren" - ein Begriff, der wie dargelegt, nur mehr als Synonym für "Bindungsstellen einer Plasmamembran" gebraucht wird, ohne eine Aussage darüber zu machen, welche Ereignisse nach bzw. hinter der Bindungsstelle infolge der Hormonwirkung ablaufen - wurde in vielen Geweben nachgewiesen: Leberzellmembran (47, 85-88), Adipocyten (89), Myokardzellen (90). Dabei erlaubten die Messungen an isolierten Zellen, im Gegensatz zu denen an Präparationen von Zellmembranen, auch eine gleichzeitige Mituntersuchung der biologischen Hormoneffekte (91-94).

Mit zunehmender Zahl der Arbeiten über Insulinrezeptoren wurde klar, daß Insulinrezeptoren (wie natürlich auch die anderen Polypeptidhormonrezeptoren) keine statischen Gebilde darstellen, sondern daß sie vielmehr in ihrer Konzentration und/oder in ihrer Affinität einem Hormon gegenüber ständigen Veränderungen unterworfen sind (33, 53, 54, 62-67, 81, 90, 91-100).

So ist die Bindung von Insulin aller bisher untersuchter Gewebe (Adipocyten (48, 103), Skelettmuskel (104), Leber (105)) bei genetisch fettsüchtigen Nagetieren um 20-35% gegenüber mageren Nagern verringert (64, 91, 98-105). Als Ursache dafür wurde ausschließlich einer Verringerung der Rezeptorkonzentration und nicht eine Abnahme der Affinität gefunden (95, 104).

Wie zuerst Olefsky erkannte (65, 104) und später von Gavin et al. (52) direkt in vitro an in insulinhaltigen Medien gezüchteten Lymphozytenkulturen bewiesen werden konnte, wird diese **Rezeptorabnahme** fast ausschließlich durch die bei Adipositas sehr häufig zu findende Hyperinsulinämie induziert (sog. 'down regulation' der Zahl der Rezeptoren)

Eine Erhöhung der **Rezeptoraffinität**, d.h. eine Erhöhung der Neigung der Rezeptoren freies Insulin spezifisch zu binden (exakte Def. siehe S. 42), wurde hingegen bei erhöhten Glukocortikoidspiegeln (106, 107) gefunden.

Umgekehrt fand sich in voller Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen eine erhöhte Insulinbindung bei hypinsulinämischen Hamstern (108) oder bei mit Streptozotocin behandelten Ratten (109).

Die an Nagetieren entwickelten und erprobten Bindungstests wurden in gleicher Weise auch angewendet zur Untersuchung menschlicher Zellen wie Adipozyten (65), Leukozyten (34, 35), Monozyten (53, 65, 67, 122, 134, 143, 144), Lymphozyten (111, 112, 125) und Fibroblasten (118). Diese Untersuchungen wurden durchgeführt bei nicht-diabetischen Übergewichtigen (54, 64-66) bei vermehrter Kalorienaufnahme (110), bei Einnahme einer Reduktionsdiät (53, 62), bei sich sportlich betätigenden Diabetikern (113, 127, 128), bei Diabetikern mit Akanthosis nigricans (114-116), bei Leprechaunismus (117-119), Anorexia nervosa (120), angeborener Lipodystrophie (121), Hyperthyreose (122) und Akromegalie (111).

Die Ergebnisse aller dieser Arbeiten sind in den Tab. 1 u. 2 zusammengestellt.

Untersucht wurde auch schon, wie sich die Insulinrezeptoren verschiedener Vertebraten gegenüber den jeweiligen Insulinen verhalten: es ergab sich, daß die Rezeptoren aller bisher untersuchten Wirbeltiere etwa dieselbe Affinität für ein und dasselbe Insulin haben, und daß die Affinität aller dieser Insulinrezeptoren zu den verschiedenen Insulinen folgendermaßen abnimmt: Insulin vom Huhn > Schwein = Rind = Mensch > Fisch > Meerschweinchen (51, 139-141). Dabei stimmt, bis auf eine Ausnahme (Insulin vom Neunauge (142)), die biologische Wirksamkeit der verschiedenen Insuline gut mit ihrer unterschiedlichen Affinität überein (49, 140, 141).

Tabelle 1

Krankheitsbilder, bei denen die Insulinbindung verändert ist.

A) INSULINRESISTENZ, VORKOMMEND BEI

URSACHEN, SOWEIT BEKANNT

- | | |
|---|--|
| 1) Übergewicht | Geringe Korrelation ($r = 0,49$) zw. Übergewicht u. Rezeptorabnahme (65) |
| 2) Nicht-insulinpflichtiger (TypII)-Diabetes mit und ohne Übergewicht | Hohe Korrelation ($r = 0,71$) zwischen Plasmainsulinspiegel u. Rezeptorabnahme (65) |
| 3) Akromegalie | Bisher widersprüchliche Ergebnisse (123). Evtl. ist die von manchen Autoren beobachtete, leichte Abnahme der Insulinbindung auf eine Abnahme der Affinität bei Glucocorticoid-Überschuß bzw. der Rezeptorzahl bei STH-Konzentrationserhöhung zurückzuführen. |
| 4) M. Cushing | |
| 5) Akanthosis nigricans | Wahrscheinlich Antikörper, die die Hormonbindung an den Rezeptor verhindern (114,123). |
| 6) Leprechaunismus | Ursache noch nicht bekannt. Die Resistenz ist vom Insulinspiegel unabhängig und liegt wahrscheinlich in einem der Hormon-Rezeptorbindung nachfolgenden Schritt (117-119) |
| 7) Lipodystrophie | |
| 8) Azidose | Akut: Abnahme der Rezeptoraffinität
Chron: Abnahme der Rezeptorkonzentration |
| 9) Insulinom | Rezeptorabnahme (137) |

B) INSULINÜBEREMPFLINDLICHKEIT

- | | |
|--------------------------|---|
| 1) Anorexia nervosa | Rezeptorkonzentration um 90 % erhöht (120) |
| 2) Glucocorticoid-Mangel | Nur geringe Empfindlichkeitssteigerung, wobei noch nicht entschieden ist, ob eine Zunahme der Affinität oder der Rezeptoren verantwortlich ist. |
| 3) STH-Mangel | |
| 4) Hyperthyreose | Hier werden zusätzliche Plasmafaktoren vermutet, die die Rezeptorkonzentration unabhängig vom Insulinspiegel erhöhen (122) |

T a b e l l e 2

FAKTOREN, die einen Einfluß auf die Insulinbindung haben:

WIRKUNG auf die Insulinrezeptoren:

1) Insulin	Negative Feedback-Regulation auf seine Rezeptoren (Beeinflußung der Affinität und der Konzentration)
2) Andere Hormone: Davon häufiger untersucht: STH Glucocorticoide	Verminderung der Rezeptorkonzentration bei <u>erhöhter Affinität</u> (wenn Insulin $< 20 \mu\text{E/ml}$), sonst Affinität normal (120, 129) Verminderung der Rezeptoraffinität bei normaler Rezeptorkonzentration (120, 129) Doch gibt es auch davon abweichende Untersuchungen (124)
3) pH	Bindung geht schon bei einem pH-Abfall von 7,4 auf 6,8 um 50 % zurück: Abnahme d. Rezeptoraffinität (125)
4) Ketonkörper	Besonders β -Hydroxy-butyrat erhöht die Rezeptorkonzentration (126, 135)
5) Medikamente Sulfonylharnstoffe (35) Biguanide (36)	Nach akuter Gabe Erhöhung der Rezeptoraffinität, nach chronischer Gabe Erhöhung der Rezeptorkonzentration (Siehe auch Kapitel I)
6) Gymnastik, Sport	Erhöhung der Rezeptorkonzentration (113, 127, 128)
7) Essen Zahl der Kalorien (53, 62, 110) Zusammensetzung (130, 131)	Verminderung der Rezeptorkonzentration bei hypercalorischer Ernährung, Vermehrung bei Fasten Vermehrte Kohlenhydrat- und Fettsäureaufnahme vermindert die Rezeptorkonzentration
8) Zustand der untersuchten Zellen: Alter (105) (132, 133, 152) Wachstum Hormonwirkungen (Stunde der Messung) Geschlecht des Untersuchten Menstruationszyklus	Rezeptorkonzentration nimmt mit zunehmendem Zellalter u. Zelldichte ab. Große Zellen haben geringere Rezeptorkonzentration pro um Zelloberfläche als kleine. Bindung maximal am frühen Morgen, dann Abnahme mit einem Minimum am Nachmittag, dann wieder stetige Zunahme, Ursache: Schwankungen in der Affinität (134) Unterschiedliche Affinität u. Konzentration der Insulinrezeptoren zwischen Männern u. Frauen (136) Unterschiedl. Insulinbindung (136, 138)

II.2 Überblick über die bisherigen Arbeiten und Ergebnisse an Erythrozyten

Erst die Möglichkeit, das Verhalten von Insulinrezeptoren an Leukozyten studieren zu können, erlaubte durch den dadurch möglichen Verzicht auf irgendwelche Probebiopsien die in Kapitel II.1 erwähnte Vielzahl von Untersuchungen am Menschen.

Zwei gravierende Nachteile bestehen jedoch bei Rezeptoruntersuchungen an kernhaltigen (weißen) Blutkörperchen:

- 1) Die Leukozyten setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, die jeweils völlig verschiedene Bindungseigenschaften aufweisen (34, 143, 144) und die schwer in reine Fraktionen zu trennen sind.
- 2) Da Insulin im wesentlichen nur von Monozyten gebunden wird (34, 143, 144, 145), sind große Mengen Vollblut notwendig (z.B. 175 ml bei (67)), um bei den verschiedenen Wasch- und Trennungsschritten noch genügend Monozytenzellen für die üblichen Bindungstests zur Verfügung zu haben.

Diese großen Blutmengen verbieten von selbst alle Verlaufsuntersuchungen, durch die dynamische Änderungen am Insulinrezeptor aufgeklärt werden sollen und die daher, wie bei vorliegender Arbeit, Bindungsstudien an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen nötig machen. Außerdem ist bei mehrmaliger Abnahme solcher großer Blutmengen nicht sichergestellt, daß nicht allein schon durch die Verringerung des durchschnittlichen Zellalters infolge der vermehrten Neubildung eine Bindungsänderung eintritt, die die eigentlich interessierende Messung in unkontrollierter, evtl. sogar unkontrollierbarer Weise verfälscht. Deshalb war es ein großer Fortschritt, als Gambhir et al. einen "Insulin-Radio-Receptor-Assay" für menschliche Erythrozyten entwickelten (68), der wegen der hohen Erythrozytenkonzentration im Blut, mit nur 15 ml Vollblut eine vollständige Bindungsuntersuchung in zwei Parallelansätzen erlaubt.

Dabei ergab bisher die Mehrzahl der Untersuchungen an Erythrozyten, daß sich deren Insulinrezeptoren prinzipiell genauso verhalten wie die von Monozyten (siehe II.1): so ist die Rezeptorkonzentration der Erythrozyten in gewohnter Weise bei Typ II-Diabetikern gegenüber Gesunden verringert (70, 145) und sie nimmt bei nicht-insulinpflichtigen Diabetikern unter Gabe von Tolinase (Tolazamide (57, 147)) und Biguaniden (36) zu. Ebenso verringert sich die Affinität der Insulinrezeptoren von Erythrozyten um 36% nach einer 5-stündigen Insulininfusion (147). Die Zahl der Insulinrezeptoren ist sowohl an Monozyten wie an Erythrozyten bei Anorexia nervosa-Patienten, wie in einem Parallelversuch nachgewiesen werden konnte, signifikant erhöht (120), wobei die Insulinbindung an Erythrozyten mit dem Faktor $r=0,982$ bezüglich der Bindung an Monozyten korrelierte.

Obwohl die biologische Rolle der Insulinrezeptoren sowohl von Monozyten wie von Erythrozyten noch unbekannt ist und obwohl sich die kernlosen Erythrozyten beträchtlich von den Zellen der insulinempfindlichen Gewebe unterscheiden, läßt sich doch nach allen bisher gemachten Erfahrungen an ihnen der Zustand und das Verhalten der Insulinrezeptoren untersuchen.

Wie in Kapitel I. schon erwähnt wurde, ist der Testansatz zur Untersuchung der Erythrozytenrezeptoren und dessen Auswertung nicht unkritisch.

Dies könnte unter anderem eine Erklärung dafür sein, weshalb die Angaben über die Affinität und die Zahl der Rezeptoren pro Erythrozyt um bis zu 7600 (!) differieren (Tab. 3). Dabei haben sich in der Zwischenzeit die Angaben über die Rezeptorzahl von ursprünglich sehr hohen Werten kommentarlos auf die auch in dieser Arbeit gefundenen Werte reduziert.

Tabelle 3: Die bisher gemachten Angaben über Affinität und Zahl der Insulinrezeptoren an Erythrozyten
(k.A. = keine Angabe)

Jahr	Autor	Messung am	Spez. Insulin- bindung %	Affinität $\times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$	Zahl der Re- zeptoren	Bemerkungen
1977	Gambhir et al. (68)	Gesunden	7,2	k.A.	k.A.	
1978	Gambhir et al. (69)	Gesunden	10,0	0,1	2000	
1979	Robinson, Gambhir et al. (70)	Diabetiker Gesunden	5,9 10,1	k.A. k.A.	190 380	
1979	Wachslight- Rodbard et al. (120)	Anorexia nerv. nach Aufbau- diät Gesunden	12,2 6,9 6,7	1,16 1,25 1,20	160 80 80	
1979	Archer, J.A. (146)	Diabetiker unter Iolinase- therapie	5,9 7,7	k.A. k.A.	188 299	
1980	De Pirro et al. (146)	Diabetiker Gesunden	7,55 8,95	3,6 4,0	29 35	Umgerechnet auf eine Zellzahl von $3,5 \cdot 10^5$ Erys
1980	Insel et al. (147)	Gesunde m. künstlicher Hyperinsulinämie	6,3 4,0	3,9 2,6	30 30	
1981	Eaten et al. (57)	Gesunde Diabetiker vor u.nach Behandl. m. Tolbutamid	6,25 3,78 7,5	1,3 2,5 1,5	69 20 68	

Fortsetzung zu Tabelle 3:

Jahr	Autor	Messung am	Spez. Insulin- bindung %	Affinität $\times 10^{-6} M^{-1}$	Zahl der Re- zeptoren	Bemerkungen
1981	Holle et al. (36)	Gesunde ohne u. mit Metformin	13,6 13,6	k.A. k.A.	26 99	Korrigierte Werte, da bei der Berechnung d. Rezeptoren- zahl den Auto- ren wohl ein fehler unter- laufen ist.
1981	Bachmann et al. (71)	Gesunden Diabetiker (Typ I)	7,9 10,0	6,1 5,25	30 35	
1981	Dons et al. (152)	Gesunden (Untersuchung des Einflusses des Ery- alters auf die Bindung)	7,5	k.A.	45 - 100	

III. EXPERIMENTELLER TEIL

III.1 Kurze Zusammenfassung der Fragestellung und der Durchführung

Wie schon oftmals beschrieben wurde (25-32), sind nach der Umstellung von oralen Antidiabetika (z.B. von Sulfonylharnstoffen) auf Insulin bei Sekundär-, evtl. auch bei Primärversagen einer oralen Monotherapie, oft hohe Dosen Insulin notwendig, ohne daß damit in jedem Fall eine befriedigende Stoffwechseleinstellung erreicht wird. Werden nun solchen Patienten zum Insulin weiterhin Sulfonylharnstoffe gegeben, so können oftmals die Blutzuckerwerte und in vielen Fällen sogar der tägliche Insulinbedarf deutlich gesenkt werden. Diese verbesserte Insulinwirkung bzw. Stoffwechseleinstellung wird wie in Kapitel I. ausführlich begründet wurde, hauptsächlich dem Einfluß der Sulfonylharnstoffe auf die Rezeptoren des peripheren Gewebes zugeschrieben.

Um diese Hypothese in direktem Vergleich zu überprüfen, wurde eine Hälfte eines Kollektivs von Patienten, deren bisherige, ausschließliche Sulfonylharnstofftherapie keine ausreichende Einstellung mehr gewährleistete (Sekundärversagen) ganz auf Insulin umgestellt - **Gruppe A** -. Die andere Hälfte wurde mit einer Insulin/Glibenclamid Kombinationstherapie behandelt - **Gruppe B** -.

Außerdem wurde bei einem mit diesen Gruppen vergleichbaren Kollektiv, das trotz hoher Insulindosen (- 80E/die) unakzeptable Glucosewerte aufwies, der Effekt einer zusätzlichen Glibenclamidgabe untersucht - **Gruppe C** -.

Neben der Auswirkung der beiden Therapieformen auf die 24-h Harnzuckerausscheidung, die Glucose-, C-Peptid- und Insulin-Konzentration im Plasma, interessierte vor allem, ob und gegebenenfalls wie sich die Insulinrezeptoren der Erythrozyten unter der jeweiligen Therapie verhalten.

Neben der medikamentösen Therapie übt ja auch die im Krankenhaus gewährleistete strikte Diabetesdiät sowie die kontrollierte Lebens-

führung einen Einfluß auf die Insulinrezeptoren und auf die Stoffwechsellage aus. Um diesen Einfluß von dem der Therapie abzugrenzen, wurden alle interessierenden Meßwerte an möglichst weit auseinanderliegenden Tagen **vor** der jeweiligen Therapieumstellung aufgenommen. (Während dieser Zeit erhielten die Gruppen A u. B dieselbe Ausgangstherapie.)

Um Änderungen der Insulinrezeptoren sowie der anderen Meßgrößen über einen längeren Zeitraum zu erfassen, wurden an mindestens drei Tagen nach erfolgter Umstellung alle Messungen durchgeführt. Hierbei stand leider dem Wunsch nach großen zeitlichen Abständen zwischen jeweils zwei Messungen der Zwang entgegen, den stationären Aufenthalt der Patienten so kurz als möglich zu halten.

Um diese Forderungen in jedem individuellen Fall zu erfüllen, wurden für die einzelnen Gruppen ungleich verteilte Meßtage festgelegt. Innerhalb einer Behandlungsgruppe wurden dann aus verschiedenen Meßtagen jeweils Mittelwerte gebildet.

III.2 Entnahme der Blutproben

Die für die Testreihen benötigten Erythrozyten wurden aus 20 ml Vollblut gewonnen, das den Patienten aus der Vena cubitalis entnommen wurde. Um eine sofortige, gleichmäßige Heparinisierung aller Blutproben zu gewährleisten - der mögliche Einfluß von Heparin auf die Insulinbindung von Erythrozyten wurde bisher noch nicht untersucht - wurden sogenannten "Vacutainer Tubes" des "Venoject Systems" der Firma Terumo, Frankfurt/M. verwendet. Es handelt sich dabei um evakuierte, mit 143 E Heparin versehene Glasröhrchen (Inhalt 10 ml), die auf eine in der Vene liegende Spezialnadel aufgeschoben werden. Sie gewährleisten durch das Vakuum bei allen Entnahmen einen gleichen, niedrigen Sog, was eine Hämolyse weitgehend ausschließt sowie eine identische Heparinkonzentration.

Die Entnahmen fanden an den in den Meßprotokollen (Kapitel IV)

angegebenen Tagen vor bzw. nach der Therapieumstellung immer vor dem Frühstück zwischen 7.30 und 8.00 Uhr statt. Der durchschnittlich 12-stündige Nüchternzustand vor der Entnahme wurde streng eingehalten, um den bekannten Einfluß einer Kalorienaufnahme auf die Insulinrezeptoren (siehe Tab. 2, Punkt 7) auszuschalten.

Alle Patienten erhielten Diabetesdiät, wobei die jeweilige tägliche Kalorienmenge, verteilt auf 6 Mahlzeiten, so berechnet^{*} wurde, daß das Patientengewicht unter den stationären Bedingungen konstant blieb. Die Begründung für den notwendigen Verzicht auf eine Reduktionsdiät bei den insgesamt deutlich übergewichtigen Patienten wurde im Kapitel I., S. 5 gegeben. Wie schon in Tab. 2, Punkt 8 erwähnt wurde, hängt die Insulinbindung von Erythrozyten direkt linear von der Zahl der Retikulozyten ($r = 0,74$)^{**} (133) und umgekehrt linear vom mittleren Alter bzw. von der mittleren Dichte mit $r = 0,94$ (133)^{**} bzw. $r = 0,790$ (152)^{**} des Erythrozytenkollektivs ab. Wie in (133) weiter gezeigt wird, kann der Einfluß des schwierigen zu bestimmenden mittleren Zellalters auf die Insulinbindung durch den einfach zu messenden Retikulozytenanteil einer Blutprobe hinreichend genau abgeschätzt werden. Deshalb wurde vor der Weiterverarbeitung (siehe nächsten Abschnitt) aus jeder abgenommenen Vollblutprobe 0,5ml für die Retikulozytenzählung abgezweigt. Sie erfolgte mikroskopisch nach Vitalfärbung mit Brillantkresylblau.

* nach den Tabellen der Fa. Hoechst/Boehringer (148) Bogsvaerd, Dänemark

** Koeffizient der jeweiligen Korrelation

III.2.1 Präparation der Erythrozyten für die Bindungsstudien

Die beiden noch mit insgesamt 19,5ml heparinisiertem Frischblut gefüllten Blutröhrchen werden sofort nach der Blutentnahme 10 Min. lang mit 400g ¹⁾ bei 20°C zentrifugiert ²⁾ (Ergebnis siehe Abb. 1). Das Plasma wird abpipettiert, genau etikettiert und eingefroren, so daß aus ihm zu einem späteren Zeitpunkt die Konzentration von C-Peptik - mittels C-Peptid RIA, vertrieben von IRE Diagnostics, Frechen - und Insulin - Insulin RIA, Novo Ind., Bogsvaerd, Dänemark - bestimmt werden können. Die 24-h-Harnzuckerausscheidung ³⁾ und die Plasmaglukosekonzentration (4) werden separat bestimmt.

Zu den in den Röhrchen verbliebenen zellulären Blutbestandteilen wird jeweils ein Volumenteil physiologische Kochsalzlösung gegeben. Nach vorsichtigem Aufschütteln der Blutzellen werden diese mit einer silikonisierten Pasteurpipette behutsam aufgesaugt und dann jeweils sehr vorsichtig (!) 3 ml einer Mixtur aus Hypaque (33,9%) -Ficoll (9%) aufgelagert (Abb. 2), so daß sich diese nicht mit der Blutprobe mischt (Abb. 3 u. 4). Die Hypaque-Ficoll Mischung wurde als fertige Lösung unter dem Handelsnamen Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) bezogen.

1) $1\text{ g} \hat{=} 9,81\text{ kpm sec.}^{-2}$

2) Zentrifuge Modell Rotixa der Fa. Hettich

3) Polarimetrische Bestimmung in 24h-Urin mittels Perkin Elmer 2435 Polarimeter

4) GOD-perid Methode der Fa. Boehringer, Mannheim

Abb. 1

Trennung der Blutzellen vom Plasma

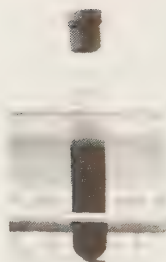


Abb. 2

Die Blutprobe ist
der Ficoll-Paque-Schicht
vorsichtig aufgelagert



Abb. 3

Blutprobe und Ficoll-Paque-
Schicht haben sich etwas gemischt



Abb. 4

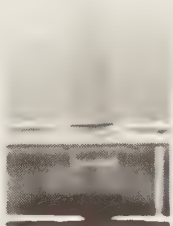
Blutprobe und Ficoll-Paque
haben sich stark gemischt



Nach 20 Min. Zentrifugation mit 400 g bei 20°C sind, wie schon von Boyum (149) et al. (150) beschrieben wurde, die Kochsalzlösung (oberste, klare Schicht in Abb.5), die Lympho-, Thrombo- und Teile der Granulozyten (weiße, schmale Schicht in Abb.5) durch die Ficoll-Paque-Schicht (die zweitunterste, leicht trübe Schicht in Abb.5) von den Erythrozyten (unterste Schicht in Abb.5) getrennt.

Abb. 5

Trennung der Lympho-, Thrombo-,
und Granulozyten von den
Erythrozyten



Mit einer Pipette, die an eine Wassertrahlpumpe angeschlossen ist, werden alle Fraktionen bis auf die unterste abgesaugt. Von dieser wird nur die oberste Schicht, die noch Granulozyten enthält, entfernt. Nachdem den so gewaschenen Erythrozyten wiederum ein Volumenanteil Kochsalzlösung (0,9%) zugesetzt worden ist, wird die eben beschriebene Prozedur wiederholt. Danach werden die Erythrozyten mit zwei Teilen eines weiter unten beschriebenen Puffer versetzt. Nach anschließender Zentrifugation im Kühlraum (400 g für 10 Min. bei 4°C) wird der überstehende Puffer abgesaugt. Die übrigbleibende Erythrozytenfraktion wird wieder in einem Volumenteil Puffer aufgeschüttelt. Die Konzentration der Erythrozyten in dieser Suspension wird zweimal in einem Coulter Counter¹⁾ gezählt, da die Höhe der spezifische Bindung einer Zellsuspension ja definitionsgemäß der Zellzahl direkt proportional ist.

Abweichungen der Zellkonzentration einer Probe vom Mittelwert aller Suspensionen ($4,4 \times 10^9$ Erythrozyten/ml) müssen deshalb durch einen Korrekturfaktor²⁾ bei der spezifischen Insulinbindung berücksichtigt werden.

1) Coulter Counter, Modell D der Firma Coulter-Electronics Ltd. Bedfordshire, England

2) Korrekturfaktor = $(4,4 : 10^9 \text{ Ery./ml}) / (\text{Gemess. Zahl Ery./ml})$

Diese so präparierte Erythrozytensuspension stellt das Ausgangssubstrat für die eigentlichen Bindungsstudien dar (siehe Abschnitt 2.4). Sie enthält nur noch weniger als 4×10^3 Leukos/ml, wie durch mehrmaliges Zählen im Coulter Counter festgestellt wurde, so daß 99,9% aller kernhaltigen Blutzellen durch den zweimaligen Waschvorgang entfernt werden konnten.

Die Erythrozyten zeigten, wenn alle beschriebenen Schritte des Präparationsvorganges sehr sorgfältig durchgeführt wurden und wenn die Herstellung des Puffers unter sterilen Kautelen möglichst alle 14 Tage erfolgte, unter dem Mikroskop keinerlei Auffälligkeiten (Abb. 6)

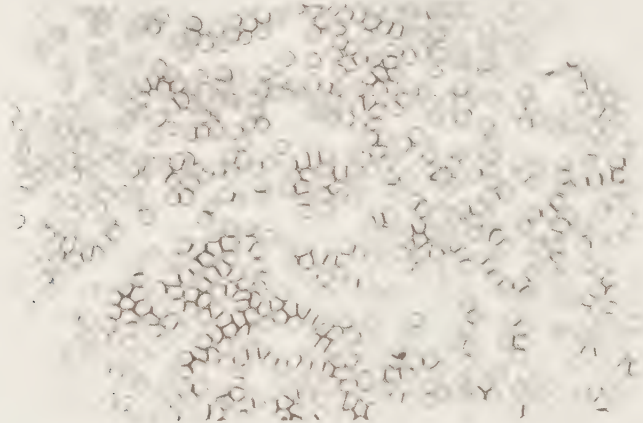


Abb. 6

Ungefärbter Ausstrich der regelrecht für die Bindungsuntersuchungen vorbehandelten Erythrozyten.

Bei Benutzung von altem Puffer, von nicht-silikonisierter Glasware oder bei mechanisch unvorsichtigem Vorgehen, z.B. abruptes Abbremsen der Zentrifuge, ergab sich schon auf den ersten Eindruck hin ein deutlich verändertes Zellbild (Abb.7).



Abb. 7

Ungefärbter Ausstrich der durch Benutzung nicht-silikonisierter Pipetten geschädigten Erythrozyten.

Die Intaktheit der Erythrozytenmembran und damit die Unversehrtheit der Zellen an sich wurde durch Färbung mit 1 %-iger Trypanblau-Lösung sichergestellt (151) (Abb. 8). Intakte Zellen färben sich nicht an (über 96 % der Erythrozyten in vorliegenden Versuchen) - im Gegensatz zu geschädigten (Abb. 8, Bildmitte).

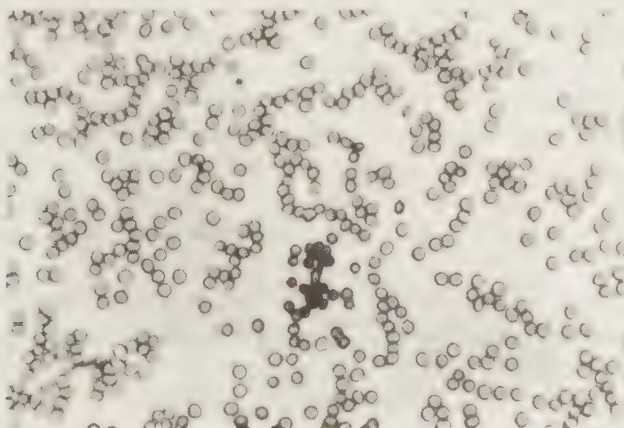


Abb. 8

Zusatz einer 1 %-igen Trypanblau-Lösung zu den gewaschenen Erythrozyten.

Geschädigte Zellen mit defekter Zytoplasmamembran färben sich an.

III.2.2 Herstellung des Puffers

Der Puffer wurde aus folgenden Stammlösungen, die bei 4°C aufbewahrt wurden, mindestens alle 14 Tage und in der voraussichtlich benötigten Menge frisch hergestellt. Er wurde im Kühlschrank (4°C) in einem fest verkorkten Gefäß aufbewahrt.

Alle Chemikalien wurden in der Qualitätsstufe p.a. von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. (Hepes: Fa. Sigma Chemical)

Konzentration im Puffer	Konzentration in der Stammlösung
-------------------------	----------------------------------

TRIS	50m mol/l	500m mol/l $\hat{=}$ 60,57 g/l
HEPES	50m mol/l	500m mol/l $\hat{=}$ 119,15 g/l
MgCl	10m mol/l	100m mol/l $\hat{=}$ 20,33 g/l
CaCl	10m mol/l	100m mol/l $\hat{=}$ 11,09 g/l
EDTA	2m mol/l	20m mol/l $\hat{=}$ 7,44 g/l
Glucose	10m mol/l	500m mol/l $\hat{=}$ 19,81 g/l
NaCl	50m mol/l	50m mol/l $\hat{=}$ 3,72 g/l

Albumin vom Rind 5 g/l

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 8,0 eingestellt¹⁾.

Bei Voruntersuchungen enthielt der Puffer, wie von Gambhir et al. empfohlen, nur 1 g/l Albumin. Doch zeigte sich im Verlauf der Messungen, daß damit die unspezifische Bindung (siehe Abschnitt III.2.5) sehr hoch war (bis zu 15% des insgesamt eingesetzten, markierten Insulins. Ein Wert, der auch von Gambhir (67) gefunden wurde).

Mit 5 g/l Albumin hingegen betrug die unspezifische Bindung nur 1,3 % ohne daß sich die Höhe der spezifischen Bindung dadurch änderte.

¹⁾ gemessen mit einem vor jeder Messung geeichten Digital-pH-Meter, Mod 4500, Fa. Beckmann Instruments, Glenrothes-fife, England

III.2.3 Durchführung der Bindungsstudien

Grundsätzlich setzt sich ein Radiorezeptorassay, ähnlich wie ein Radioimmunoassay aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1) Dem Rezeptor, dessen Präparation im Abschn. III.2.2 beschrieben wurde.
- 2) Dem radioaktiv markierten Hormon, das ja direkt mittels eines Zählrohres gemessen werden kann.
- 3) Dem nicht markierten Hormon, welches entsprechend seiner Bindungsaffinität mit dem markierten Hormon um die Bindungsstellen am Rezeptor konkurriert. Aus der Verdrängung des markierten Hormons vom Rezeptor in Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten unmarkierten Hormons lassen sich die Eigenschaften der Rezeptoren (Anzahl, Affinität; siehe Kapitel III.2.5) bestimmen.

Das radioaktiv markierte Mono ^{125}J -(Tyr. A14)-Insulin wurde von der Firma Novo (Kopenhagen, Dänemark) bezogen und besaß, von Probe zu Probe etwas verschieden und natürlich vom Tag der Markierung an in erster Näherung mit einer e-Funktion abnehmend eine spezifische Radioaktivität von 200-250 Ci/g.

Das in Pulverform angelieferte Insulin wurde mit Puffer auf eine Konzentration von 800 pg/ml verdünnt, in 700 μl -Portionen aufgeteilt und bei -18°C bis zum Gebrauch eingefroren. Ein mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren entsprechend größerer Vorratsportionen (wie von Gambhir (68) angewandt und empfohlen), führte zu einer Degradation des Insulins, wie bei Voruntersuchungen festgestellt werden mußte.

Aus dem gleichen Grund wurde das nicht-markierte Insulin (Geschenk der Fa. Hoechst, Frankfurt/M.), als "kalte Reihe" portioniert eingefroren. Nach dem Auftauen kann mittels einer solchen Reihe, die sich aus verschiedenen Einzelportionen nicht-markierten (kalten) Insulins aufsteigender Konzentration zusammensetzt, die entspre-

chende Verdrängung des markierten Insulins vom Rezeptor gemessen werden.

In Eppendorf-Cups wurden folgende Insulinkonzentrationen als kalte Reihe mit jeweils 50 µl Puffer pipettiert (Angaben in µE/ml oder (ng/ml)).

0 (0); 2,5 (0,1); 5 (0,2); 10 (0,4); 50 (2,0); 100 (0,4); 500 (20,0); 1000 (40,0); 10.000 (400); 2,5 E/ml (100 µg/ml).

Zu jeder Einzelkonzentration dieser kalten Reihe wurden 50 µl (=40 pg), frisch aufgetautes ¹²⁵J-markiertes Insulin pipettiert. Zur genauen Bestimmung der im Versuch eingesetzten Gesamtradioaktivität wurde zu Beginn, in der Mitte und zum Schluß des Pipettiervorgangs je 50 µl heißes Insulin in insgesamt drei Polystyrolröhrchen A,B,C pipettiert.

Im nächsten Schritt wurden in jedes Eppendorf-Cup noch jeweils 400 µl der in Abschnitt III.2.1. beschriebenen Erythrozytensuspension gebracht, so daß jedes dieser Cups nun insgesamt 0,5 ml (400 µl Ery.- Suspension. + 50 µl Puffer mit heißem + 50 µl Puffer mit kaltem Insulin) enthielt.

In und zwischen dieser Erythrozyten/Insulinmischung findet nun der eigentliche Bindungsvorgang statt.

Es stellt sich nun die Frage, welche Inkubationstemperatur und -dauer zu wählen ist.

Niedrige Temperaturen bedingen sehr lange Inkubationszeiten (69), höhere führen durch eine Insulin- und Rezeptordegradation nicht zur Erreichung eines über längere Zeitabschnitte konstanten Sättigungszustandes (69).

Als Inkubationsdauer wurde von anderen Autoren Zeitspannen zwischen 2 h (133) und 3,5 h (57, 69, 145, 146, 152) gewählt.

Gambhir et al. untersuchte den Einfluß der Inkubationstemperatur und -zeit auf die Höhe der Insulinbindung (69). Da die von ihm angegebene Bindungskurve bei 15°C Inkubationstemperatur (Figur 3 in (69)) nach 3,5 h noch kein Maximum bzw. keinen konstanten Zu-

stand erreicht hatte, obwohl er für weitere Messungen auch in einer späteren Publikation (70) 3,5 h als Inkubationsdauer wählte, wurde diese Messung mit Erythrozyten von vier jungen, nicht-nüchternen Männern wiederholt. Die Mittelwerte sowie die mittleren Fehler dieser Messungen sind in Abb. 9 graphisch dargestellt.

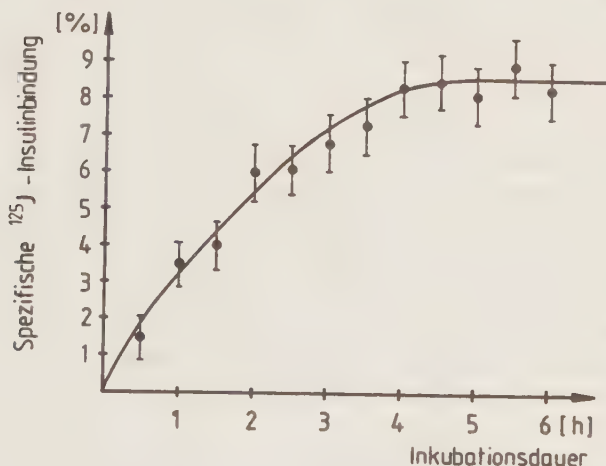


Abb.9

Einfluß der Inkubationsdauer auf die Höhe der Insulinbindung

Aus der Meßkurve geht hervor, daß nach 3,5 h ein konstantes Plateau noch nicht erreicht ist. Bei einer Inkubationsdauer von 4,5 h hingegen war das Maximum der Bindung sicher erreicht ohne daß, auch bei noch längeren Inkubationszeiten, schon eine Dissoziation des Insulins am Abfall der Bindungskurve erkennbar wurde. Ebenso konnte bei dieser Inkubationsdauer noch keine Degradation des Insulins (das nach dieser Inkubationszeit nicht gebundene, markierte Insulin konnte abgetrennt und für eine weitere Bindung verwendet werden, ohne daß eine Änderung der Bindungskurve auftrat) bzw. der Erythrozytenrezeptoren festgestellt werden. Letzteres wurde aus dem Umstand geschlossen, daß die Zahl der Erythrozytenrezeptoren auch nach 6 h-Inkubation dieselbe war wie nach 4 h. Die Affinität

war allerdings bei 3 h-Inkubation scheinbar verringert, da alle Auswertemethoden (näheres in Abschnitt III.2.4) voraussetzen, daß ein thermodynamisches Gleichgewicht für die Bindung erreicht ist, d.h., daß die Assoziationskonstante gleich der Dissoziationskonstante ist.

In vorliegender Arbeit wurde für alle Bindungsstudien an Erythrozyten eine **Inkubationstemperatur** von 15°C und eine **Inkubationszeit** von 4,5 h gewählt.

Die Inkubation fand unter leichten horizontalen Rüttelbewegungen (Frequenz ca 1,5 Hz.) in einem temperaturstabilisierten Wasserbad bei 4°C Raumtemperatur (Kühlkammer) statt. Die Art der Mischbewegung (horizontale Schüttelbewegung oder Rotation um eine Achse senkrecht zur Cupspitze) hatte keinen Einfluß auf die Höhe der Bindung solange nur eine gute Durchmischung ohne allzu große Beschleunigungskräfte sichergestellt war. Diese beiden Bedingungen werden jedoch im allgemeinen am besten durch eine Rotation erfüllt. Die Trennung der Erythrozyten mit dem gebundenen Insulin vom ungebundenen freien Insulin fand in folgendem Trennungsschritt statt:

2 x 10 Eppendorf-Cups werden mit je 200 µl Puffer und 200 µl Dibutylphtalat* gefüllt und auf 4°C abgekühlt. In jedes dieser Gefäßpaare wird nach der Inkubation aus dem entsprechenden Gefäß der inkubierten Reihe je 2 x 200 µl der Erythrozyten/Insulinsuspension pipettiert (Abb. 10).

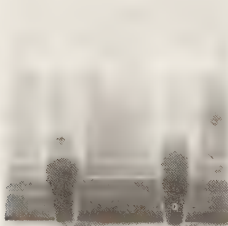


Abb. 10

Zwei Eppendorf-Cups zur Doppelbestimmung des an Erythrozyten gebundenem ¹²⁵J-Insulins. Jedes enthält 200 µl Puffer, 200 µl Dibutylphtalat und 200 µl der inkubierten Erythrozythen/Insulin - Suspension.

* Phtal-Dibutylester

Das Dibutylphthalat eignet sich als Trennmittel deshalb so gut, weil seine Dichte ($\rho = 1,043$) zwischen der von Erythrozyten und Puffer liegt, und weil es weder die Erythrozytenmembran beeinflusst, noch sich mit dem wässrigen Puffer, in dem das freie Insulin gelöst ist, mischt.

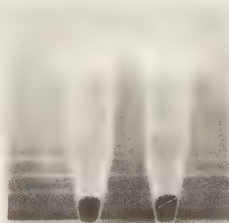
Nach 2,5 Min. langer Zentrifugation der Cups in einer Beckmann Mikrozentrifuge bei 4°C (dies, um eine Insulindissoziation vom Rezeptor zu verhindern) bilden sich im Gefäß drei Schichten aus. (Abb.11).

Die oberste Schicht wird von dem zugesetzten Puffer gebildet, in dem das ungebundene Insulin (markiertes wie nicht-markiertes) gelöst ist. In der Mitte befindet sich die Dibutylphthalat-Trennschicht, am Grund die Schicht der Erythrozyten mit dem gebundenen Insulin.

Abb. 11

Trennung der Erythrozyten vom Puffer, in dem das freie Insulin gelöst ist:

Obere Schicht	: Puffer mit freiem Insulin
Mittlere Schicht	: Dibutylphthalat
Untere Schicht	: Erythrozyten mit gebundenem Insulin



Zur vollständigen Isolation der allein interessierenden Erythrozytenschicht wird der Puffer sowie das Dibutylphthalat über eine Bülow-Drainageflasche (zur Abscheidung des radioaktiv kontaminierten Puffers) mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Bei einer solchen Absaugvorrichtung wird der von Gambhir et al. (68) bei manueller Abpipettierung festgestellte Effekt so gut wie nicht beobachtet, daß der Puffer Bläschen bildet, die sich der Dibutylphthalat-Schicht untermischen. Solche, freies Insulin enthaltende

Pufferbläschen können dann eine erhöhte ^{125}J -Insulinbindung vortäuschen.

Zum Schluß wird die die Erythrozyten enthaltende Spitze des Eppendorf-Cups mittels eines glühenden Wolframdrahtes abgeschnitten und in ein Zählröhrchen gebracht (Abb.12). Dadurch werden eventuell an den Gefäßwänden noch haftende Pufferreste von der eigentlichen Zählprobe (Cup-Spitze mit den Erythrozyten), die zudem erst nach dem Abschneiden in das enge Zählröhrchen paßt, getrennt.



Abb.12

Zählröhrchen mit der abgeschnittenen Cup-Spitze, in der sich die Erythrozyten befinden, deren ^{125}J -Insulinbindung gemessen werden soll.

Die Zählröhrchen mit den Proben werden in einen γ -Zähler¹⁾ gestellt, der die jeweilige Radioaktivität vollautomatisch mißt, und als Counts/Meßzeit ausdrückt. Diese Zählrate²⁾ ist der Zerfallsrate²⁾ des radioaktiven Isotops und damit natürlich auch der Radioaktivität³⁾ der Probe proportional. Um den Fehler⁴⁾ der beobachteten Zählrate klein zu halten, wurde eine Meßzeit $t = 5 \text{ min.}$ gewählt. (Nähere Fehlerbetrachtung siehe Kapitel VI). Die Auswertung der vom Zähler gelieferten Meßwerte wird im nächsten Abschnitt (III.2.4) beschrieben.

1) Automatic Gamma System Modell 1195 der Fa. Searle, Nuclear Div., Chicago, USA

2) Zählrate = Zerfallsrate x Zählausbeute ($\hat{=}$ Gerätekonst.)

3) $1 \text{ m Ci} \hat{=} 2,20 \times 10^6 \text{ Zerfälle/Min.}$

4) Relative Standardabweichung der Zählrate $\hat{=} (\text{Zählrate} \times t)^{-1/2}$

III.2.4 Auswertung der Bindungsstudien

Die im γ -Zähler¹⁾ gemessene Radioaktivität setzt sich aus drei Anteilen zusammen:

- 1) Aus der Radioaktivität des an die Rezeptoren der Erythrozyten gebundenen, markierten Insulins.

Diese Bindung besitzt eine Sättigung und wird **spezifische Bindung**²⁾ genannt.

- 2) Aus der Radioaktivität des nicht spezifisch gebundenen ^{125}J -Insulins, das sich noch in der Probe befindet. Entweder, weil es an der insgesamt großen Erythrozytenoberfläche adsorbiert und durch den Trennungsvorgang nicht abgeschieden wird oder weil dieser nicht sauber genug durchgeführt wurde. Bei allen Trennungsvorgängen über einen Dichtegradienten ist die Güte der Auftrennung in einzelne Fraktionen u.a. eine Funktion der Zentrifugalkraft und der Zeit, in der diese einwirkt. Beide Größen lassen sich jedoch nicht beliebig vergrößern, da sich sonst auch das spezifisch gebundene Insulin wieder löst oder gar die Plasmamembran beschädigt wird.

Diese sogenannte **unspezifische Bindung** zeigt keine Sättigung, sondern ist der Insulinkonzentration proportional (49). Ihre Höhe hängt außerdem noch stark von den experimentellen Bedingungen (Temperatur, Qualität des markierten Hormons, Art und Konzentration der Rezeptorpräparation) ab (59).

1) Autom. Gamma Counter Modell 1195, Searle Nuclear Div., Chicago, USA

2) Wenn bisher von "Bindung" die Rede war, so war darunter immer die spezifische Bindung gemeint.

- 3) Aus der Radioaktivität der immer vorhandenen Umgebungsstrahlung (besonders bei Kontamination des Zählers), dem sog. Nulleffekt. Dieser wurde durch die Messung eines leeren Zählröhrchens bestimmt und direkt von der Zählrate der Meßproben abgezogen.

Bei Relativmessungen genügt es, wenn nur die unspezifische Bindung, in der ja auch ein Nulleffekt-Anteil steckt, von der Gesamtbindung abgezogen wird.

Bei Absolutmessungen muß die durch den Nulleffekt bedingte Zahl der registrierten Zerfälle (= Counts) sowohl von den Counts der Gesamtbindung als auch von der unspezifischen Bindung abgezogen werden.

Denn, wie leicht für den allgemeinen Fall gezeigt werden kann (siehe Kapitel VI) unterscheidet sich dieses exakte Ergebnis von dem, das man bei dem bisher nur üblichen Abzug der unspezifischen Bindung ohne Berücksichtigung des Nulleffekts erhält.

Als Maß für die Höhe der spezifischen Bindung ist die absolute Höhe der gebundenen Radioaktivität untauglich: Diese hängt vom verwendeten Isotop, von dessen Alter und Konzentration ab. Der Prozentsatz hingegen, zu dem der im Versuch eingesetzte Tracer gebunden wird, ist eine konstante Größe (bezüglich der drei Parameter) und daher als Maß brauchbar:

Prozentsatz der gebundenen (Gesamt-) Radioaktivität =

$$\frac{\text{(Radioaktivität der Erythrozytenprobe)}}{\text{(Gesamt-Radioaktivität des Versuchs)}} \times 100$$

$$\text{(Gesamt-Radioaktivität des Versuchs)} \times 0,4$$

Formel I

Die Radioaktivität der im Versuchsansatz (insg. 500µl) eingesetzten 50µl markierten Insulins wurde mit den Glasröhrchen A, B, C (S. 26) dreifach bestimmt. Der Mittelwert dieser Messung muß aber noch auf die Menge markierten Insulins umgerechnet werden, die

sich in der 200µl Erythrozyten/Insulin-Suspension befindet, welche in den Trennungsschritt nach der eigentlichen Bindung eingebracht (S. 29) und anschließend vom γ -Zähler registriert wird. Dieser **Umrechnungsfaktor** f ($f = 2/5 \hat{=} 0,4$) ist in Formel I bereits berücksichtigt.

Die **unspezifische Radioaktivität** wird folgendermaßen erfaßt:

Unter der Annahme, daß markiertes wie unmarkiertes Insulin mit gleicher Affinität reversibel um denselben Rezeptor konkurriert, müßte bei einem Überschuß kalten Insulins das heiße vom Rezeptor, entsprechend dem Verhältnis der beiden Konzentrationen, fast völlig verdrängt werden. Gäbe es keine unspezifische Bindung, dann dürfte in einer Probe, die entsprechend große Mengen kalten Insulins enthält, nach dem Trennungsschritt keine Radioaktivität mehr nachweisbar sein. Oder, im Umkehrschluß, die bei einer solchen Probe noch nachweisbare Radioaktivität kann nicht durch die spezifische Bindung des ^{125}J -Insulins an die schon besetzten Rezeptoren erklärt werden, sondern muß von einer wie auch immer gearteten, unspezifischen Bindung herrühren.

Gemäß dieser Definition wurde die unspezifische Bindung nach der Formel I aus derjenigen Radioaktivität berechnet, die der γ -Zähler bei Zugabe eines 1250-fachen Überschusses an kaltem Insulin (2,5 E/ml $\hat{=} 100\mu\text{g/ml}$ vs. 80 pg/ml ^{125}J -Insulin) in der Probe noch mißt. Der berechnete Prozentsatz der gebundenen Radioaktivität bei Zusatz von 2,5 E/ml unmarkiertem Insulin (= unspezifische Bindung) wird jeweils von der für jede Insulinkonzentration gemessen, gebundenen Gesamtradioaktivität abgezogen, was als Ergebnis den Prozentsatz der spezifischen Bindung liefert. Denn es gilt:

Spez. Bindung (%) = Gesamtbindung (%) - unspezifische Bindung (%)

Wie schon in Abschnitt III.2.2 angeführt wurde, hängt die Höhe der spezifischen Bindung linear von der Menge der Erythrozyten im Testansatz ab.

Als Ergebnis der im Kapitel III.2.1. beschriebenen Präparationspro-

zedur erhält man eine Erythrozyten-Suspension mit einer durchschnittlichen Erythrozytenkonzentration von $4,4 \times 10^9$ Erythrozyten/ml. 400 μ l aus dieser Suspension, entsprechend $1,76 \times 10^9$ Erythrozyten wurde in den Inkubationsansatz gegeben, der außerdem noch $2 \times 50 \mu$ l Puffer + Insulin, also insgesamt 500 μ l enthält (siehe Abschnitt III.2.4.), was einer Konzentration von $3,52 \times 10^9$ Erythrozyten/ml entspricht.

Bis auf zwei Ausnahmen (132, 145) beziehen alle Autoren der in dieser Arbeit ausgewerteten Erythrozytenstudien (siehe Tab. 3) die jeweils gemessene spezifische Bindung auf diese Erythrozytenkonzentration im Inkubationsansatz.

Abweichungen von dieser Konzentration wirken sich auf die Höhe der gemessenen Gesamtbindung aus und müssen daher durch den schon auf S. 21 angegebenen Korrekturfaktor berücksichtigt werden. Ob als Bezugsgröße die Erythrozytenkonzentration nach dem letzten Präparationsschritt ($4,4 \times 10^9$ Erythrozyten/ml) oder aber im Inkubationsansatz ($3,52 \times 10^9$ Erythrozyten/ml) gewählt wird, spielt natürlich keine Rolle, wenn nur die Ist-Erythrozytenkonzentration im entsprechenden Ansatz gemessen bzw. für den entsprechenden Ansatz umgerechnet wird.

Nach der Definition der unspezifischen Bindung ($\hat{=}$ Bindung in Gegenwart von 2,5 E/ml kaltem Insulin) ist auch diese von der Erythrozytenkonzentration abhängig und muß ggf. auch durch denselben Faktor korrigiert werden. Die Notwendigkeit dieser Korrektur kann auch anschaulich dadurch erklärt werden, daß für die unspezifische Bindung u.a. Adsorptionphänomene verantwortlich gemacht werden (49), deren Höhe sicherlich von der Größe der absorbierenden Oberfläche und damit von der Zahl der Erythrozyten im Testvolumen abhängt.

Zusammengefaßt wird die spezifische Bindung für jede Insulinkonzentration in der "kalten Reihe" folgendermaßen berechnet:

Spezifische Probe_i =

$$\frac{(\text{Counts der Probe}_i) \times 100}{(\text{Counts der einges. Radioaktivität}) \times 0,4} \times \frac{4,4 \times 10^9 \text{ Erys/ml}}{\text{Gemess. Zahl Erys/ml}}$$

$$- \left(\frac{(\text{Counts der Probe mit } 2,5 \text{ E/ml} \times 100)}{(\text{Counts für die einges. Radioakt.}) \times 0,4} \right) \times \frac{4,4 \times 10^9 \text{ Erys/ml}}{\text{Gemess. Zahl Erys/ml}}$$

= zusammengefaßt ... = (Counts d. Probe_i - Counts d. Probe mit 2,5 E/ml) ×

$$\times \left(\frac{100}{(\text{Counts für die einges. Radioakt.}) \times 0,4} \right) \times \frac{4,4 \times 10^9}{\text{Gemess. Zahl Erys}}$$

Der Aufwand zur Berechnung der spezifischen Bindung ist also gering, da der multiplikative Faktor für eine Reihe nur jeweils einmal berechnet werden muß. Durch den Einsatz eines programmierbaren Taschenrechners läßt sich dieser Aufwand noch weiter verringern (in dieser Arbeit wurden Rechner vom Typ HP 65 und 67 der Fa. Hewlett Packard, Fort Collins, USA verwendet).

Die so für jede Insulin-Konzentration berechneten Prozentsätze der spezifischen Bindung des radioaktiv markierten ¹²⁵J-Insulins werden zur anschaulichen Auswertung graphisch als Funktion des Logarithmus der insgesamt eingesetzten Insulin-Konzentration dargestellt. Aus dieser von Bjerrum (153) erstmals angegebenen Verdrängungskurve (markiertes Insulin wird von unmarkiertem in steigender Konzentration vom Rezeptor verdrängt) lassen sich folgende Eigenschaften der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung ablesen:

- 1) Die Höhe der spezifischen Bindung bei alleiniger Anwesenheit von markiertem Insulin (d.h. die Konzentration des unmarkierten Insulins beträgt 0 E/ml) als ein Maß für die Bindungsfähigkeit und -bereitschaft der Rezeptoren für das Hormon. Sie wird, in dieser Darstellung nicht ohne weitere Auswertung unterscheidbar, sowohl durch die Zahl der Rezeptoren als auch durch die Stärke der Affinität der Rezeptoren für das Hormon bestimmt. Deshalb lassen sich mittels dieser Art der Darstellung irgendwelche Einflüsse und Zustände, die eine Wirkung auf den Rezeptor ausüben, besonders deutlich erkennen und miteinander vergleichen. Dies gilt natürlich nur, solange sich die Zahl der Rezeptoren und ihre Affinität nicht gegenläufig verändern, also z.B. die Zahl der Rezeptoren bei gleichzeitiger Abnahme ihrer Affinität zunimmt. Ein solches Verhalten wurde aber bisher noch nicht beobachtet (siehe Tab. 1 und 2).
- 2) Die Form der Kurve ermöglicht eine qualitative Aussage über die Affinität und Kapazität des Rezeptors für das entsprechende Hormon. So ist ein schneller Abfall der Kurve auf kleine Werte für die spezifische Bindung bei zunehmender Insulinkonzentration ein Hinweis für eine große Affinität bei kleine Kapazität.

Um nun eine aus den Verdrängungskurven deutlich erkennbare Änderung im Bindungsverhalten näher zu untersuchen und um insbesondere die Anzahl der Bindungsstellen sowie deren Affinität bestimmen zu können, müssen andere graphische Methoden herangezogen werden.

Eine Reihe solcher graphischer Verfahren wurde bereits entwickelt und diskutiert (154, 156, 164), bei denen die Meßwerte - der Grad der spezifischen Bindung bzw. der Quotient von gebundenem zu freiem Hormon sowie die Konzentration bzw. Menge des gebundenen Hormons - in lineare (Scatchard-Plot (157, 160)) semilogarithmische (Schild-Plot (159)) oder doppellogarithmische (Thompson-Plot (158, 166)) Koordinatensysteme doppelreziprok (Scott-Plot (161, 165)) oder proportional (157, 162) eingetragen werden. Von allen diesen Verfahren zur Bestimmung der Affinitäts- oder Assoziations-"Konstanten"

K^* und der Zahl der Bindungsstellen R hat sich das historisch älteste (157) allgemein durchgesetzt: noch ältere Methoden (159, 160) waren ursprünglich nur zur Auswertung von Enzymreaktionen entwickelt worden, neuere (158, 161, 162, 165, 166) brachten keinen Vorteil oder nur bei Bindungsstudien an Rezeptoren, die ganz bestimmte, seltene Eigenschaften aufweisen, wie z.B. eine sehr hohe Affinität (163) oder eine große Kapazität (164), die nicht vollständig gesättigt werden kann.

Bei der schon erwähnten, allgemein verwendeten graphischen Darstellung nach Scatchard (157) wird der Quotient $(B)/(F)$ der Konzentrationen von spezifisch gebundenem (B) und freiem, ungebundenem Insulin (F) an der Ordinate, die absolute Menge oder auch die Konzentration des spezifisch gebundenen Hormons B an der Abzisse aufgetragen (siehe Abb. 15).

Aus der negativen Steigung der in einem solchen Koordinatensystem konstruierten Kurve läßt sich dann sofort die Affinität des Rezeptorsystems für ein Hormon berechnen. Wird die Kurve verlängert, so daß sie die Abzisse schneidet (wird also der Grenzwert $\lim_{F \rightarrow \infty} B/F \rightarrow 0$ gebildet), dann gibt dieser Schnittpunkt die maximale Bindungskapazität $n_{\max}$ des Rezeptorsystems an. Aus dem numerischen Wert dieser Kapazität läßt sich die Zahl der Insulinrezeptoren pro Erythrozyt berechnen.

Zum Beweis dieser Behauptung soll die einfache, reversible, bimolekulare Bindung von freiem Hormon (H) und Rezeptor (R) zu einem Hormon-Rezeptor-Komplex (HR) näher betrachtet werden.

* Im thermodynamischen Gleichgewicht gleich der Dissoziationskonstanten. Diese "Konstanten" sind, wie im folgenden noch näher ausgeführt wird, keine Konstanten im eigentlichen Sinne, da sich ihr Wert kontinuierlich als Funktion der Rezeptorbesetzung ändert

Es gilt



K_1 ; $K_2 \hat{=}$ Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante.

Befindet sich das System im Gleichgewicht, so kann man nach dem Massenwirkungsgesetz schreiben:

$$\frac{[H] \cdot [R]}{[HR]} \hat{=} \frac{K_2}{K_1} = \frac{1}{K} \quad (1)$$

wobei der Quotient $K_2/K_1 = K$ als Assoziationskonstante bezeichnet wird.

Wenn die Hälfte der Rezeptoren mit dem Hormon gesättigt ist, d.h. bei halbmaximaler Bindung gilt:

$$[R] = [HR] \xRightarrow{1} [H] = 1/k \text{ bzw. } K = \frac{1}{[H]}$$

K gibt dabei die Affinität an, da diese Konstante umgekehrt gleich der Konzentration an freiem, ungebundenem Hormon ist, welche die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren sättigt. Je geringer aber diese Hormonmenge ist, je größer also K ist, desto größer ist die Affinität der Rezeptoren zu einem bestimmten Hormon.

Die Gesamtzahl der Rezeptoren in einem bestimmten System sei R_0 , dann gilt:

$$[R_0] = [R] + [HR] \quad \text{oder} \quad [R] = [R_0] - [HR] \quad (2)$$

[B] gebe die Konzentration des gebundenen, [F] die des freien Hormons an, dann gilt:

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{[HR]}{[H]}$$

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{[HR]}{[H]} = K \times [R] \quad (1) \quad (3)$$

Wird nun (2) in (3) eingesetzt, dann folgt:

$$\frac{[B]}{[F]} = K ([R_0] - [B]) = -K ([B] - [R_0]) \quad (4)$$

Diese Gleichung (4) entspricht einer Gleichung der Form:

$$y = m \underbrace{(x - \text{const})}_{\hat{=} : x'}$$

Durch Koeffizientenvergleich sieht man sofort, daß

$$K = -m \quad \text{ist}$$

d.h., die negative Steigung der Kurve in der Scatchard Darstellung gibt die Affinität K an.

Werden bei unendlicher Konzentration von freiem Hormon, also bei $\lim [F] \rightarrow \infty$ alle Rezeptoren besetzt, so gilt:

$$\lim_{[F] \rightarrow \infty} \frac{[B]}{[F]} \rightarrow 0$$

Für Gleichung (4) gilt in diesem Fall:

$$\lim_{[F] \rightarrow \infty} \frac{[B]}{[F]} = 0 = K ([R_O] - [B])$$

$$[R_O] = [B]_{\lim_{F \rightarrow \infty}} = [B'] \quad (5)$$

Dies bedeutet, daß der Schnittpunkt der Scatchard-Kurve mit der x-Achse eine Hormonkonzentration $[B']$ angibt, die von den Rezeptoren insgesamt bei totaler Sättigung maximal gebunden werden kann. Von dieser maximal gebundenen Insulinkonzentration ausgehend kann dann sofort die Anzahl der im System vorhandenen Bindungsstellen bzw. deren molare Konzentration angegeben werden:

$$\text{Zahl der Rezeptoren} = \frac{\text{mol/l des gebundenen Insulins} *}{(\text{Zahl der Erys})/l \text{ im Testansatz}} \times 6,023 \times 10^{23} \quad (6)$$

Die Erythrozytenkonzentration ist bekannt, die vom System maximal gebundene, molare Insulinkonzentration (gemessen in mol bzw. mol/l, das Testvolumen kürzt sich heraus) kann aus $[B]$ (gemessen in ng bzw. ng/ μ l) berechnet werden.

Wenn die Affinität K der Rezeptoren zum Insulin konstant wäre, dann müßte, wie aus Gleichung (4) sofort zu erkennen ist, der Graph $[B]/[F]$ gegen $[B]$ - also der Scatchard-Plot der den Quotienten von gebundenem zu freiem Insulin aufträgt - eine gerade Linie mit der Steigung $-K$ sein.

* Die Molekulargewichte von Insulin betragen: Mensch: 5807; Rind: 5733; Schwein: 5777

Bei der Bindung von Hormonen an die dafür spezifischen Rezeptoren ergibt sich in der Scatchard-Darstellung hingegen in aller Regel keine Gerade - Ausnahme: Bindung des Wachstumshormons STH an Lymphozytenrezeptoren (167) - sondern eine Hyperbel mit einer von $[B]$ abhängigen Steigung, d.h., K ist eine Funktion von $[B]$: $K = K([B])$. Mit anderen Worten verringert sich, wie die Analyse einer Scatchard-Darstellung zeigt (siehe z.B. Abb. 15), die Affinität K stetig mit zunehmender Rezeptorsättigung. Diese kontinuierliche Änderung der Affinität kann prinzipiell durch

- a) das Vorhandensein mehrere unabhängiger, heterogener Rezeptortypen,
- b) durch negative Kooperativität bei der Bindung an eine homogene Rezeptorklasse, oder aber
- c) durch das Zusammenwirken dieser beiden Ursachen (mehrere heterogene Rezeptorklassen, die negativ unter- und miteinander kooperieren) bedingt sein. Aus den Bindungsdaten bzw. -kurven allein läßt sich allerdings in keinem Fall erkennen, was nun die Ursache für die Affinitätsänderung ist.

Da Hyperbel-Funktionen generell zwei Asymptoten besitzen, die nicht mit den Achsen des Koordinatensystems identisch zu sein brauchen, wurden lange Zeit in viele Scatchard-Kurven zwei Hauptsteigungen bzw. -tangente hineininterpretiert, denen jeweils die Affinität und Kapazität zwei voneinander verschiedener Rezeptorklassen - eine mit Rezeptoren hoher Affinität aber geringer Bindungskapazität, die andere mit Rezeptoren niederer Affinität aber großer Kapazität - zugeordnet wurden (78, 168-172). De Meyts und Mitarbeitern gelang dann der experimentelle Beweis (168), daß die Bindung des Insulins an einen Rezeptor die Abnahme der Affinität der Nachbarrezeptoren bewirkt. In dieser Arbeit konnte nämlich gezeigt werden, daß bei zunehmender Sättigung von ursprünglich leeren Rezeptoren mit kaltem Insulin die Dissoziation von heißem Insulin, das an andere Rezeptoren gebunden war, zunimmt.

Die negative Steigung der Scatchard-Kurve, die ja nach Gleichung (4) die Affinität K angibt, kann für jede Konzentration $[B]_i$ graphisch durch Anlegen der Tangente am interessierenden Punkt i der Kurve und durch Bestimmung deren Steigung ermittelt werden. Die exakte Berechnung ist noch einfacher:

Wie sich sofort aus Gleichung (4) durch elementare Umformung ableiten läßt, gilt für die Affinität K ($[B]$) folgende Gleichung:

$$K ([B]) = \frac{[B]/[F]}{[R_0] - [B]} \left[\frac{1}{\text{ng}} \text{ bzw. } \frac{1}{\text{mol}} \right] \quad (7)$$

Aus den bekannten Größen $[B]$, $[F]$ und $[R_0]$ läßt sich also die Affinität K berechnen.

Werden nun diese so ermittelten Werte für K nicht gegen die gebundene Insulinmenge B, sondern gegen den dekadischen Logarithmus von B/R_0 , der relativen Rezeptorsättigung ("fractional occupancy") aufgetragen, so ergibt sich der sogenannte **average affinity plot** von De Meyts und Roth (173). Er gibt anschaulich die mittlere oder durchschnittliche Affinität K der Rezeptormannigfaltigkeit an, wenn die relative Rezeptorsättigung von 0 bis 1 bzw. von 0 % bis 100 % zunimmt. Man erhält durch ihn eine anschauliche Vorstellung für den Grad der Wechselwirkung zwischen den einzelnen Rezeptoren (den site-site interactions).

Eine solche average-affinity-Kurve (siehe z.B. Abb. 16) besitzt für Insulinrezeptoren wegen deren negativen Kooperativität zwei Extrema:

Ein Maximum bei sehr geringer Rezeptorsättigung, bei der sich eine maximale Rezeptoraffinität K_e einstellt ("empty-sites" conformation), da hierbei nahezu alle Rezeptoren unbesetzt sind und ein Minimum, d.h., ein unterer Grenzwert der Affinität K_f , wenn die Rezeptoren besetzt sind ("filled sites" conformation). Aus der Form der "average-affinity"-Kurve lassen sich, wie De Meyts et al. ausführlich theoretisch gezeigt haben (171), besonders deutlich neben der negativen Kooperativität eine ganze Reihe von funktionellen Störungen

gen der Rezeptoren erkennen:

So erniedrigen Insulin-Antikörper die Maximalaffinität K_e , ein saurer pH drückt die Affinität K der Insulin-Rezeptoren für jeden Sättigungsgrad auf den K_f -Wert, und eine erhöhte Temperatur verringert die Affinität der Rezeptoren schon bei niedrigem Besetzungsgrad, um nur die wichtigsten Beispiele zu nennen.

Mit diesen drei beschriebenen, graphischen Verfahren lassen sich alle Eigenschaften der Insulinrezeptoren vollständig bestimmen.

III.2.4.1 Die verwendeten statistischen Testverfahren zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse

Es muß sichergestellt werden, daß die in vorliegender Studie erhaltenen Ergebnisse (siehe Kapitel IV. und V.) wirklich der Insulin/Sulfonylharnstoff-Kombinationstherapie zuzuschreiben sind und nicht auf Zufall basieren. Mit anderen Worten muß geprüft werden, ob die Nullhypothese (die Kombinationstherapie hat keinen Einfluß auf die spezifische Insulinbindung) verworfen und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p die Alternativhypothese: "Die Kombinationstherapie hat einen Einfluß" angenommen werden kann.

Zur Wahl des geeigneten Testverfahrens müssen folgende Eigenschaften der Meßwerte berücksichtigt werden (174, 175):

- 1) Alle zu vergleichenden Meßwerte sind verbunden (Synonyma sind gepaart, paarig oder abhängig), da sie jeweils an gleichen Patienten vor und nach Therapieänderung gewonnen werden.
- 2) Ein Teil der Meßwerte (Urinzuckerausscheidung) ist normal verteilt, bei einem anderen Teil (spezifische Insulinbindung der Erythrozyten, C-Peptid-Konzentration im Plasma) kann eine Normalverteilung (oder genauer eine de-Moivre-Verteilung) nicht unbedingt angenommen werden. Auf die Gefahr hin, daß die Wahrscheinlichkeit einen Fehler zweiter Art zu begehen (falsche Verwerfung der Alternativhypothese) etwas größer wird, soll hierfür ein verteilungsfreier oder nicht-parametrischer Test (176) verwendet werden. Für den erstgenannten Fall wird daher der Student t-Test* für letzteren der Wilcoxon Test, beide für gepaarte Meßwerte, gewählt.

* Dieser Test wurde von William Sealy Gosset entwickelt, der ihn 1908 unter dem Pseudonym "Student" publizierte, da er durch seinen Anstellungsvertrag mit der Guinness-Brauerei in Dublin verpflichtet war, wissenschaftliche Arbeiten nicht unter seinem eigenen Namen zu veröffentlichen.(177)

Um die Straffheit (oder Stärke) der Korrelation zwischen Änderung der spezifischen Insulinbindung und Höhe der täglichen Insulindosis zu berechnen, wird der Spearmann'sche Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. Er ist wiederum, im Gegensatz zum üblicherweise verwendeten Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r , verteilungsfrei.

Da bei dem Vergleich der Ränge im Rahmen der vorliegenden Meßwerte sogenannte 'ties' auftreten - ties: Bindungen treten dann auf, wenn bei der Rangtransformation zwei oder mehrere Originalwerte gleich sind und deshalb dieselbe durchschnittliche Rangnummer zugeteilt bekommen müssen - darf nicht die meistens angegebene Formel zur Berechnung der Spearmann'schen Rangkorrelationskoeffizienten r_s mit

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n D_i^2}{n(n^2-1)}$$

mit $D_i = \text{Rang des Meßwertes}(x_i) - \text{Rang des Meßwertes}(y_i)$

angewendet werden.

Um Fehler zu vermeiden, muß vielmehr die etwas ausführlichere Formel

$$r_s = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{\sqrt{\left[n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right] \left[n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \right]}}$$

benützt werden (175).

Alle statistischen Rechnungen erfolgten durch selbstgeschriebene Programme auf einem programmierbaren Taschenrechner HP 65 der Fa. Hewlett-Packard.

Um die Gleichheit der beiden Patientengruppen A und B bei ihrer Aufnahme statistisch abzusichern, als Voraussetzung um irgendwelche Änderungen der Meßwerte unter den beiden verschiedenen Therapien miteinander vergleichen und eventuelle Unterschiede bei der Entlassung den unterschiedlichen Therapien zuordnen zu können, wurden unerbundene Testverfahren verwendet. Für die de-Moivre verteilten Meßwerte wurde der t-Test für verbundene Meßwerte, für die nicht normalverteilten Werte der nicht parametrische Mann-Whitney U-Test angewendet.

IV. Die Meßwerte und Diskussion der für die einzelnen Gruppen erhaltenen Ergebnisse

In vier Abschnitten, für die Gruppen A, B, C und eine "Normalgruppe" getrennt, sind in tabellarischer Form alle für die vorliegende Studie relevanten Daten und Meßwerte aufgeführt. In den letzten zwei Zeilen jeder Tabelle sind die Standardsabweichungen S bzw. S.D. (standard deviations), die mittleren Fehler (SEM: standard error of means) sowie die Mittelwerte $\bar{x}$ (M.W.) der Werte jeder Reihe aufgeführt.

Im Anschluß an die Meßdaten sind die entsprechenden graphischen Darstellungen der zeitlichen Änderung aller Meßwerte unter dem Einfluß der jeweiligen Therapie zu finden.

Die in den einzelnen Abschnitten erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel V. zusammengefaßt diskutiert.

IV.1 GRUPPE A (Klassische Therapie)

Umstellung von Glibenclamid auf Insulin

Diese Gruppe wurde entsprechend der derzeit gültigen Therapieempfehlung von Glibenclamid (Euglucon 5) das keine ausreichende Stoffwechsellaage mehr sicherstellte, ganz auf Insulin umgestellt.

Die Gruppe bestand aus 10 Patienten (4 Männer, 6 Frauen), deren nähere Daten der Tab. auf S.52 zu entnehmen sind. Sie wurde von 2-0-1 Tabletten Euglucon 5 auf zwei Insulininjektionen mit durchschnittlich 24,4 E morgens bzw. 8,8 E Dep Hoe CR abends umgestellt. Unter dieser Therapie verringerte sich die durchschnittliche **Harnzuckerausscheidung** vom 5. Tag vor Therapieumstellung bis zum 7. Tag danach von 33,5 g auf 3,8 g pro Tag signifikant mit $p < 0,01$ einseitig.

Die über den 9.00 Uhr und 13.00 Uhr-Blutzuckerwert gemittelte, durchschnittliche **Plasmaglukosekonzentration** veränderte sich von 324 mg/100 ml auf 207 mg/100 ml signifikant mit $p < 0,0025$.

Unter der Therapie **verbesserte** sich also die **Stoffwechsellaage signifikant**.

Die **Insulinbindung** an die Erythrozyten dieser Patientengruppe A wurde erstmalig 4,7 Tage vor der Therapieumstellung gemessen. Die spezifische Bindung des radioaktiv markierten Hormons bei Abwesenheit von Nichtmarkiertem betrug dabei 8,2 %. Dieser Wert stieg leicht über 8,44 % 2,5 Tage vor der Umstellung auf 8,79 % am Tage der Therapieumstellung an, um dann über 8,29 % auf 7,59 % zurückzugehen. Der Anstieg der spezifischen Bindung während des stationären Aufenthaltes vor der Therapieumstellung ist, nach Aussage des Wilcoxon-Tests, nicht signifikant. (Da eine Nulldifferenz existiert, vermindert sich n um 1 auf $n = 9$ mit dem kritischen Wert 5 für $p = 0,05$ zweiseitig. Die Rangzahl beträgt $8 \Rightarrow n.s.$). Ohne diese Nulldifferenz wäre die Erhöhung der spezifischen Bindung vor der Therapieumstellung, unter den kontrollierten Bedingungen eines Klinikaufenthaltes, auf 5%-Niveau signifikant.

Eine Erklärung für diesen Trend im Verhalten der spezifischen Bindung können die Arbeiten (53, 62, 100, 130, 131, siehe auch Tab.2) geben, in denen die Bedeutung einer Diät und einer kontrollierten Kalorienaufnahme auf die Höhe der Bindung gezeigt wurde.

Der Rückgang der **spezifischen Bindung** von 8,79% am Tage der Therapieumstellung auf 7,59 % 5,6 Tage danach ist mit $p \leq 0,01$ zweiseitig signifikant (Rangsumme zwei, kritischer Wert drei). Das bedeutet, daß unter der Insulintherapie mit durchschnittlich 33,6 E Insulin/Tag, sich die spezifische Bindung innerhalb von 5,6 Tagen signifikant verringert hat.

Um zu untersuchen, ob eine **Korrelation zwischen der Höhe der Insulingabe** und dem **Rückgang der spezifischen Bindung** besteht, wurde der Spearmann'sche Rangkorrelationskoeffizient r_s bestimmt. Er beträgt $r_s = 0,56$ (kritischer Wert für $p = 0,05$ einseitig bei $n = 10$: $r = 0,564$).

Das bedeutet: es besteht eine, wenn auch nur gerade auf 5% Niveau signifikante Korrelation zwischen der Höhe der individuellen Insulindosis und dem Rückgang der spezifischen Insulinbindung.

Der Unterschied in der Bindung kurz nach der stationären Aufnahme der Patienten (4,7 Tage vor Therapieumstellung, spezifische Bindung 8,20 %) und kurz vor der Entlassung (5,6 Tage nach Umstellung, spezifische Bindung 7,59%) ist **nicht** signifikant.

Durch die ärztliche Verpflichtung, Patienten nach erfolgreicher Therapie umgehend zu entlassen, konnte der Einfluß der Insulinmedikation auf die Insulinbindung nur durchschnittlich 5,6 Tage lang untersucht werden. Zwar nahm die spezifische Bindung in dieser Zeit kontinuierlich (und gegenüber dem Wert bei der Therapieumstellung auch signifikant) ab, da jedoch die Höhe der Bindung der übergewichtigen Patienten bei ihrer stationären Aufnahme relativ niedrig war, wurde die Abnahme der Bindung nach einer Periode der Zunahme in dem kurzen Zeitintervall nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu ist die Abnahme der **C-Peptid-Spiegel** während der Insulintherapie von durchschnittlich 0,55 $\mu\text{g/l}$ auf 0,32 $\mu\text{g/l}$ nüchtern (für $p = 0,01$ zweiseitig beträgt der kritische Wert 3, Rangsumme 0) sowie von 0,82 $\mu\text{g/l}$ auf 0,60 $\mu\text{g/l}$ (Rangsumme 1) gemessen nach dem Frühstück hochsignifikant.

D.h. durch **Zufuhr von Insulin** wird die **körpereigene Insulinproduktion** auf subnormale Werte **vermindert** (Normbereich: 0,54 - 3,0 µg/l entsprechend 0,18 - 1,0 mol/l).

Zu dieser Aussage paßt, daß die geringe Abnahme der C-Peptid-Konzentration vom ersten Meßtag 4,7 Tage vor Therapieumstellung bis zum Tag der Therapieumstellung (zweite Messung) nicht signifikant, sondern eine zufällige Schwankung ist.

Der statistische Zusammenhang zwischen der verminderten Insulinausschüttung bzw. der **C-Peptid-Konzentration** und der Menge des **zugeführten Insulins** wurde mittels der Spearmann'schen Rangkorrelation geprüft: Zwischen der Höhe der täglichen Insulindosis und der Abnahme des Nüchternwertes der C-Peptid-Konzentration besteht ein Korrelationskoeffizient $r_s = 0,43$ bei einem kritischen Wert $r = 0,564$ für $p = 0,05$ einseitig. Dieser Wert ist demnach nicht signifikant. Erst ab einer Fallzahl $n = 16$ würde er signifikant werden.

Der postprandiale Wert der C-Peptid-Konzentration und die tägliche Insulindosis sind sogar überhaupt nicht korreliert ($r_s = 0,02$).

Durch die tägliche Zufuhr von Insulin (33,60 E am sechsten Tag nach der Umstellung von Euglucon 5 auf Insulin) erhöht sich die **Plasma-Insulin-Konzentration**, gemessen um 8.00 Uhr (vor dem Frühstück und vor der morgendlichen Insulininjektion) von 18,94 µE/ml am 4,7. Tag vor, auf 28,00 µE/ml am 5,6. Tag nach der Therapieumstellung. Der postprandiale 10.00-Uhr-Insulinspiegel stieg im gleichen Zeitraum unter der Therapie von 40,06 µE/ml auf 52,57 µE/ml. (Normalwerte der Insulin-Konzentration: Basal 11 ± 5 µE/ml ($\bar{x} \pm S.D.$)), nach Belastung mit 100 g Glucose 103 ± 68 µE/ml).

Trotz der Zunahme um 48% bzw. 30% ist dieser Anstieg der Insulin-Konzentration nicht signifikant ($p > 0,05$ einseitig). Da die Meßwerte jedoch stark streuten, kann eine Verbesserung der Stoffwechsellaage infolge einer Anhebung der Plasma-Insulin-Konzentration nicht ausgeschlossen werden, obwohl der Wilcoxon-Paardifferenzen-Test keine Signifikanz ergab.

Die Änderung aller bisher erwähnten Meßwerte unter der Therapie sind in Abb. 12 und 13 graphisch dargestellt. Daran schließen sich die verschiedenen, in Kapitel III.2.4 ausführlich beschriebenen graphischen Verfahren zur näheren Auswertung der Bindungswerte bzw. zur Bestimmung der Zahl und Affinität der Insulinrezeptoren an (Abb. 14-16).

Die Scatchard-Kurven schneiden die x-Achse vor Therapiebeginn bei 1,1 mg, am Tag nach der Therapieänderung bei 1,0mg und 5,6 Tage nach dieser bei 0,82 mg (Abb. 15).

Nach Formel (6) im Abschnitt III.2.4 läßt sich daraus die **jeweilige Zahl der Rezeptoren pro Erythrozyt berechnen**. Diese beträgt bei einem Molekulargewicht von 5777 für Insulin vom Schwein (auf ganze Zahlen gerundet): 33 (4,7 Tage vor Therapieänderung), 30 (bei Therapieänderung) bzw. 24 pro Erythrozyt (5,6 Tage nach Therapieänderung).

Die Zahl der Rezeptoren nahm also unter der Insulin-Monotherapie um 27% von 33 auf 24 Rezeptoren ab.

Die Auswertung des average affinity plots (Abb. 16) ergibt, daß die Umstellung auf Insulin keinen Einfluß auf die Rezeptoraffinität hat. Die 'empty sites affinity', also die Affinität der Rezeptoren zu Insulin, wenn nur wenige der Rezeptoren besetzt sind (hier: 0,4%) beträgt $5,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, die 'filled sites affinity', die sich hier einstellt, wenn mehr als 30% der Rezeptoren besetzt sind, beträgt ebenfalls, unabhängig vom Meßtag, ca. $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

A	Pat.	Geschl.	Alter	Ist- Gew. kp	Größe cm	Triglyzeride mg / 100ml	Cholesterin mg / 100ml	Augenbefund	Zweiterkrankungen	Medikamente	
										Beginn	Ende
Herr J.B.	männl.	—	62	67,0	162	252 mg/dl	152 mg/dl	Re. Auge Prothese l. i. Auge O.B.	Alkoholische (aberzellsch.) Nierenkolik infolge Konkre- ment (Praesekal.) Beginnende Schwindsucht, beginn. der Uls	Diabetisch	Nicht Diabetisch
			8	56	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 24E - 0 - 6 Dep.Hoe. CR	Lanitolomite 3 x 1/2 Dytide H 1 x 1	
Frau A.F.	weibl.	—	64	57 46	154	134 mg/dl	181 mg/dl	O.B.	Polypurpathia diab. Hypertonie 160/90 Mama-OP	2 - 0 - 1 Euglucon 5 32/01 Dep.Hoe. CR	Lanitolop 2 x 1 Dytide 1 x 1
			9	46	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 44 - 0 - 18 Optisulin	Lanitolop 1 x 1 Dytide H 1 x 1	
Frau E.G.	weibl.	—	67	56,8 42,0	148	328 mg/dl	234 mg/dl	Fundushypertonibus et scleroticus	Reizdivertikul (autonomes Ad- nom?) Vulvovaginitis, mäßiges Lungenemphysem	2 - 0 - 1 Euglucon 5 44 - 0 - 18 Optisulin	Lanitolop 1 x 1 Dytide H 1 x 1
			12	42,0	—	—	—	—	62 - 0 - 10 Euglucon 58 - 0 - 38 Dep.Hoe. CR	Lanitolop 1 x 1, Dytide 4 1 x 1; Nepressol 3 x 1, Lanitolop 0-0-2 Tabl., Gelusil- Tabl. 3 x 2	
Frau V.G.	weibl.	—	64	66,3 55	161	412 mg/dl (258 mg/dl) (290 mg/dl)	411 mg/dl (335 mg/dl)	Retinopathia diabetica II	Schleimhautpolyp im Ösophagus Präpylorischer Ulcus mit Blut- ungen, Hypertonie, Herzin- suffizienz	2 - 0 - 1 Euglucon 5 16 E Dep.Hoe. CR	keine
			10	55	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 16 E Dep.Hoe. CR	keine	
Herr A.H.	männl.	—	81	72 68	170	118 mg/dl	206 mg/dl	O.B.	Ausgezeichneter AZ	2 - 0 - 1 Euglucon 5 16 E Dep.Hoe. CR	keine
			4	68	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 24 E/0 Dep.Hoe. CR	keine	
Frau A.H.	weibl.	—	73	49,5 47	154	598 mg/dl Kontrolle i Normbereich	220 mg/dl	O.B.	O.B., , Güter AZ	2 - 0 - 1 Euglucon 5 24 E/0 Dep.Hoe. CR	keine
			9	47	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 28 E Ins. Leo Mixtard	Novodigal 1-0-0; Catapreson 150 3 x 1/2 Dytide H 1 x 1; Depos. mite 3x1, Exatolol 1/45/1/45/1/2	
Frau K.K.	weibl.	—	69	65 53	163	249 mg/dl	291 mg/dl	Glaukom, Beginnende Retinopathia diabe- tica	Herzinsuffizienz bei arteri- eller Hypertonie Harnwegsinfekt	2 - 0 - 1 Euglucon 5 28 E Ins. Leo Mixtard	Novodigal 1-0-0; Catapreson 150 3 x 1/2 Dytide H 1 x 1; Depos. mite 3x1, Exatolol 1/45/1/45/1/2
			9	53	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon Glucophage 3 x 1	keine	
Herr K. Sch.	männl.	—	41	79,8 66	173	273 mg/dl	206 mg/dl (264 mg/dl)	Re. Auge Maculadegeneration Schwachsichtigkeit sonst O.B.	Struma diffusa I-II Re. Auge Maculadegeneration	2 - 0 - 1 Euglucon 20 E - 0 - 8 Dep.Hoe. CR	keine
			10	66	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 24E - 0 - 12 Dep.Hoe. CR	Dytide H 1-0-0; Catapreson 150 3 x 1/2 Nepressol 1-0-1	
Herr E. Sch.	männl.	—	65	83,5 71	178	86 mg/dl	120 mg/dl	O.B.	Billroth II., Hypertonie	2 - 0 - 1 Euglucon 5 24E - 0 - 12 Dep.Hoe. CR	Dytide H 1-0-0; Catapreson 150 3 x 1/2 Nepressol 1-0-1
			30	71	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 24E - 0 - 12 Dep.Hoe. CR	Dytide H 1-0-0; Catapreson 150 3 x 1/2 Nepressol 1-0-1	
Frau B.W.	weibl.	—	59	57 47	154	225 mg/dl	298 mg/dl	Beginnende Macula- generati. keine R. diabetica	Kardiales Magen-CA, ohne Metastasen, komp. Herzinsuffi- zienz bei O.B. und Hypertonie Z.N.R., chron. Nierenschwäche	2 - 0 - 1 Euglucon 5 28/12 E Dep. Hoe. CR	Dytide H 1x; Isoket ret. 3 x 1; Gelusil Loc 4 x 1 Btl.; Novodi- gal 2 x 1, Oracep 3 x 1
			3	47	—	—	—	—	2 - 0 - 1 Euglucon 5 28/12 E Dep. Hoe. CR	Dytide H 1x; Isoket ret. 3 x 1; Gelusil Loc 4 x 1 Btl.; Novodi- gal 2 x 1, Oracep 3 x 1	
Standardschw.	Mitl. Fehler	—	10,33 ± 3,77	10,80 ± 3,42	S = 9,60 ± 3,04	S = 152,50 ± 48,22	S = 83,61 ± 26,44	S = 59,61 ± 18,22	S = 12,45 ± 3,76	S = 12,45 ± 3,76	S = 12,45 ± 3,76
			± 2,84	± 3,21	± 3,21	± 3,21	± 3,21	± 3,21	± 3,21	± 3,21	± 3,21
Summe	—	—	64,50 10,40	65,39 55,10	161,70	267,50	231,90	231,90	231,90	231,90	231,90
			—	—	—	—	—	—	—	—	—

A	Tage vor Therapieumstellung					Tag der Therapieumstellung					Tage nach Therapieumstellung				
	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7		
Pat.															
Herr	BZ 900, 332	330	328	262	185	211	238	240	242	259	243	300			
J.B.	1300 345	349	117	259	237	169	178	188	206	232	286	165			
357,5	HZ 33,5	8,5	4,2	10,5	7,7	—	1,3	—	Sp.	2,9	2,8	Sp.			
Frau	BZ 310	342	275	260	245	293	245	266	246	226	314	241			
A.F.	1300 270	235	344	331	290	157	179	202	164	197	157	175			
290	HZ 7,0	—	—	—	1,2	1,5	—	0,2	—	0,9	0,4	—			
Frau	BZ 334	299	326	316	316	341	329	303	278	273	255	243			
E.G.	1300 233	296	274	268	264	260	241	200	159	188	180	210			
283,5	HZ 21,0	14,0	—	12	10,8	10,6	13,6	12,5	12,0	11,4	5,4	3,5			
Frau	BZ 401	388	410	275	365	302	265	254	240	277	274	287			
V.G.	1300 266	302	285	355	310	279	205	200	195	182	221	224			
253,5	HZ 20	19,9	11,4	18,1	16,3	9,9	5,5	Sp.	2,5	5	5,3	12,6			
Herr	BZ 384	360	292	273	260	181	175	140	102	66	80	80			
A.H.	1300 302	302	244	302	214	118	105	100	86	109	120	100			
343	HZ 15	—	—	7,4	7,0	4,5	Sp.	0,5	—	—	—	—			
Frau	BZ 293	296	305	312	330	223	256	330	318	295	280	260			
A.H.	1300 216	211	231	202	218	200	179	218	156	150	144	195			
254,5	HZ 3,7	4,5	4,4	1,6	2,5	2,2	3,1	3,6	4,0	0,8	0,8	0,4			
Frau	BZ 341	341	340	340	374	301	280	298	325	262	250	240			
K.K.	1300 419	404	429	302	174	93	140	166	191	291	280	270			
386	HZ 11	11,0	10,7	11	1,5	1,0	—	—	0,3	0,5	0,2	—			
Herr	BZ 343	343	343	343	340	340	258	260	289	272	252	171			
K.Sch.	1300 427	427	427	427	329	287	236	251	220	205	193	151			
315	HZ 110	110	110	109,4	52,4	69,4	44,5	25,3	21,0	16,9	8,0	3,2			
Frau	BZ 254	254	364	339	332	325	230	230	227	263	293	244			
E.Sch.	1300 283	283	366	279	319	195	240	314	230	220	212	222			
268,5	HZ 57	57,2	81,6	49,2	49,6	18,9	8,4	11,0	26,1	22,30	18,5	12,0			
Frau	BZ 410	410	408	228	243	210	212	317	140	147	153	270			
B.W.	1300 280	280	283	347	375	228	346	216	106	323	357	344,5			
345	HZ 57	57	57,3	59,1	n.d.	23,2	14	4,7	11,2	12,8	10,0	6,7			
Stand-	BZ 345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345			
antib-	1300 345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345			
weich.	HZ 345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345			
M.W.	BZ 340,40	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8			
	1300 340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340			
HZ	33,52	25,34	20,63	28,56	28,56	28,56	28,56	28,56	28,56	28,56	28,56	28,56			

A	Tage vor Therapieumstellung					Tag der Therapieumstellung		Tage nach Therapieumstellung						
	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	
Pat														
Herr J.B.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon	—	—	12 0 4	16 0 0	18 0 0	20 0 0	20 0 0	20 4	24 0 6	12 — 12	
Frau E.G.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	20 0 6	24 0 8	30 0 8	34 0 10	40 0 10	40 0 10	40 0 12	40 — 16	
Frau A.F.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	16 0 4	20 0 4	26 0 6	26 0 6	30 0 4	30 0 0	32 0 0	32 — 0	
Frau V.G.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	0 10 10	16 0 10	20 0 10	20 0 12	20 0 12	24 0 12	24 0 16	24 — 16	
Herr A.H.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	16 0 6	16 0 4	20 0 4	20 0 0	22 0 0	18 0 0	16 0 0	16 — 0	
Frau A.H.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	16 0 10	20 0 6	24 0 8	24 0 8	24 0 0	24 0 0	24 0 0	24 — 0	
Frau K.K.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon	—	—	22 0 6	20 0 4	20 0 4	20 0 0	26 0 0	26 0 6	26 0 10	26 — 10	
Herr K.Sch.	—	—	—	2-0-1 Eugluon	—	16 0 8	16 0 8	16 0 8	16 0 8	20 0 12	24 0 12	24 0 12	24 — 10	
Herr E.Sch.	<—	—	2 - 0 - 1 Eugluon 5	—	—	18 0 12	24 0 12	24 0 12	24 0 12	24 0 12	24 0 12	24 0 12	24 — 12	
Frau B.W.	—	—	—	2 - 0 - 1 Eugluon	—	14 0 10	18 0 12	22 0 14	24 0 14	24 0 12	22 0 12	22 0 12	22 — 12	
						$s = 5.16$ ± 1.60	$s = 3.16$ ± 1.10	$s = 4.11$ ± 1.30	$s = 4.92$ ± 1.55	$s = 6.43$ ± 1.74	$s = 8.14$ ± 2.01	$s = 8.86$ ± 2.02	$s = 9.37$ ± 2.03	
						$s = 3.16$ ± 1.10	$s = 4.11$ ± 1.30	$s = 5.16$ ± 1.55	$s = 6.43$ ± 1.74	$s = 8.14$ ± 2.01	$s = 9.37$ ± 2.03	$s = 10.59$ ± 2.04	$s = 11.81$ ± 2.05	
						15	19.00	22.00	22.80	25.00	25.20	25.60	26.40	
						1	0	0	0	0	0	0	0	

A	Tage vor- nach (4)	Therapie	Blut- zucker 9 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml	Gewicht kg	Spezifische Bindung [%]									
					Insulin µE/ml	nüchtern postprandial			µE/ml kaltes Insulin									
									0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	E 2,5 ml
Herr J.B.	- 3	330 309	—	9,5	28,21 45,25	18,91 48,17	1,0 2,01	67,0	11,91	12,08	11,52	9,88	6,46	4,64	2,59	1,80	0,71	1,29
Frau A.F.	- 2	275 344	—	Ø	21,34 42,36	0,87 1,27	—	58,3	8,79	8,37	7,89	7,86	4,03	3,76	2,54	1,75	0,33	1,61
Frau E.G.	- 4	299 296	—	14,0	19,07 44,75	0,51 1,02	—	56,8	8,87	8,33	7,21	6,88	4,35	3,74	1,17	1,05	0,61	0,87
Frau V.G.	- 3	320 280	—	11,4	20,55 23,29	0,82 0,83	—	67,0	4,62	3,54	3,34	2,17	1,70	1,25	0,73	0,54	0,16	1,41
Herr A.H.	- 3	360 264	—	Ø	6,57 10,91	0,30 0,51	—	72	9,89	9,18	8,36	5,16	3,87	1,80	1,34	0,96	0,63	1,33
Frau A.H.	- 3	296 206	—	5,2	24,15 61,31	0,72 1,10	—	49,2	6,71	5,53	5,36	5,02	3,48	2,89	2,02	1,54	0,56	1,73
Frau K.K.	- 2	340 429	—	10,7	28,69 37,32	0,49 0,54	—	65,0	6,23	5,83	5,60	4,48	3,07	1,94	1,04	0,87	0,42	0,99
Herr K. Sch.	- 1	343 427	—	109,4	6,09 12,71	0,30 0,36	—	79,8	10,64	9,66	8,86	8,44	5,69	4,47	2,27	1,89	0,60	1,07
Herr E. Sch.	- 3	254 283	—	57,2	28,21 36,90	0,26 0,63	—	83,5	8,93	7,82	7,66	7,18	5,26	3,92	1,80	1,64	0,45	1,17
Frau B.W.	- 1	228 347	—	59,1	12,50 21,97	0,55 0,75	—	57,0	8,79	8,46	7,98	6,43	4,76	3,40	1,60	1,41	0,83	0,93
Stuhl- nach der nächsten Harn- unters. Werte	S=0,97 ± 0,31	S=0,218 ± 13,37 S=50,25 ± 25,21	S=25,97 ± 11,38 S=0,48 ± 5,16	S=0,26 ± 0,09 S=0,48 ± 0,16	S=10,75 ± 3,40	S=2,41 ± 0,67	S=2,40 ± 0,76	S=2,23 ± 0,70	S=2,22 ± 0,40	S=1,37 ± 0,43	S=1,17 ± 0,57	S=0,64 ± 0,20	S=0,46 ± 0,15	S=0,19 ± 0,06	S=0,29 ± 0,09	S=0,25 ± 0,09	S=0,19 ± 0,06	S=0,25 ± 0,09
Werte- nach	-2,50	304,50 318,50	27,65	18,61 33,97	0,58 0,90	6,57	8,44	7,88	7,38	6,35	4,27	3,18	1,74	1,35	0,53	4,24	1,24	4,24

Stand with white
and feet wind
under

A	Pat.	Tage vor- nach (+) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		Gewicht kg	spezifische Bindung [%]									
					µE/ml nüchtern	µE/ml postprandial		µE/ml kaltes Insulin									
								0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	25 $\frac{\mu}{l}$
Herr J.B.		0	185 — 237	7,7	13,11 — 41,22	0,65 — 1,07	67,0	11,69	10,77	10,00	9,64	5,12	4,24	1,82	1,43	0,29	1,18
Frau A.F.		0	245 — 290	1,4	21,08 — 57,17	0,87 — 1,27	58,7	9,38	9,01	8,57	7,79	4,63	3,77	2,68	2,01	0,28	1,65
Frau E.G.		0	316 — 264	10,8	26,01 — 54,00	0,51 — 1,02	55,0	8,87	8,33	7,21	6,88	4,35	3,74	1,17	1,05	0,61	0,87
Frau V.G.		0	365 — 310	16,3	15,62 — 76,59	0,74 — 0,90	67,0	4,65	4,07	3,61	2,79	1,80	1,35	1,03	0,88	0,55	1,76
Herr A.H.	-1	0	273 — 302	12,60 — 14,97	7,95 — 22,99	0,21 — 0,54	72,0 — 0,7	9,54 — 9,70	8,31 — 9,06	7,74 — 8,49	6,86 — 5,56	4,99 — 4,44	2,86 — 3,14	1,53 — 1,56	0,81 — 0,90	0,50 — 0,65	0,53 — 1,85
Frau A.H.		0	330 — 218	2,5	27,13 — 57,96	0,69 — 1,07	49,4	7,05	6,42	5,76	5,27	4,06	3,21	2,43	1,89	0,66	1,54
Frau K.K.		0	374 — 174	1,5	29,17 — 42,11	0,53 — 0,68	65	7,16	6,16	5,55	5,22	3,49	2,46	1,05	0,88	0,56	0,72
Herr K.Sch.		0	303 — 329	52,4	9,10 — 15,14	0,30 — 0,36	79,8	12,14	10,52	10,09	9,47	6,40	5,52	2,37	1,83	0,95	1,09
Herr E.Sch.		0	339 — 279	49,2	24,12 — 37,29	0,28 — 0,36	83,5	7,68	6,82	6,65	5,72	4,18	3,29	1,57	1,29	0,41	1,25
Frau B.W.		0	243 — 375	41	18,87 — 29,17	0,73 — 0,91	57	9,54	8,31	7,74	6,86	4,99	2,86	1,53	0,81	0,50	0,53
Standard- anweisung des Falken Labor		0	56,85 — 19,24 — 66,33 — 43,08	20,00 — 6,45 — 18,03	7,55 — 2,39 — 18,03 — 5,85	5=0,22 — 0,04 — 0,32 — 0,41	5=10,87 — 3,44 — 65,44	5=2,25 — 0,71 — 0,71	5=2,08 — 0,66 — 0,66	5=2,05 — 0,65 — 0,65	5=2,08 — 0,66 — 0,66	5=1,19 — 0,37 — 0,37	5=1,10 — 0,35 — 0,35	5=0,59 — 0,19 — 0,19	5=0,47 — 0,15 — 0,15	5=0,20 — 0,06 — 0,06	5=0,45 — 0,14 — 0,14
W.H.		0	296 — 269	18,38	19,22 — 43,36	0,55 — 0,82	65,44	8,79	7,95	7,37	6,52	4,35	3,36	1,72	1,30	0,55 0,25	1,24

A	Tage vor- nach (+) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin µE/ml nüchtern postprandial	C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%]										10 ⁴	500	1000	10 ⁴ 25 ml
							µE/ml kaltes Insulin													
							0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	E 25 ml				
Pat	Herr J.B.	+ 1	211 169	—	16,04 38,40	0,70 1,47	67,0	11,90	11,48	11,05	10,05	6,43	4,16	2,15	1,17	0,51	0,85			
	Frau A.F.	+ 2	245 179	—	21,19 51,06	0,57 0,77	58,7	8,22	7,62	7,25	6,43	4,02	3,41	2,34	1,73	0,26	1,21			
	Frau F.G.	+ 2	329 241	13,6	51,08 55,89	0,49 0,97	55,0	7,85	7,98	6,99	6,18	4,23	3,25	1,29	1,23	0,39	0,77			
	Frau V.G.	+ 1	302 279	9,9	7,62 13,88	0,67 0,89	67,0	4,71	3,71	3,55	2,55	1,93	1,62	1,02	0,92	0,62	1,87			
	Herr A.H.	+ 1	181 118	—	9,12 26,50	0,1 0,34	72	10,25	9,89	8,90	7,19	5,40	3,67	2,33	1,50	0,64	1,65			
	Frau A.H.	+ 2	256 179	3,1	23,61 48,17	0,65 1,02	49,4	6,23	5,86	5,20	4,69	3,63	2,71	1,94	1,42	0,40	1,56			
	Frau K.K.	+ 2	280 140	—	38,17 51,44	0,53 0,68	65	6,85	6,34	6,08	5,10	3,95	1,99	1,63	1,28	0,51	1,12			
	Herr K.Sch.	+ 1	360 267	69,4	15,50 20,13	0,24 0,33	79,8	10,64	9,66	8,86	8,44	5,69	4,47	2,27	1,89	0,60	1,07			
	Herr E.Sch.	+ 2	325 195	18,9	21,08 52,52	0,28 0,36	83,5	6,42	5,81	5,63	4,26	3,10	2,66	1,33	0,94	0,36	1,32			
	Frau B.W.	+ 2	212 346	14	29,98 38,05	0,41 0,41	57	9,85	8,85	8,44	7,80	5,37	3,72	1,68	1,06	0,42	1,36			
	Statistik	S = 0,52 ± 0,16	S = 58,33 ± 18,65 S = 92,04 ± 23,54	S = 24,08 ± 6,67 S = 77,88 ± 17,11	S = 12,33 ± 4,23 S = 77,88 ± 17,11	S = 0,20 ± 0,07 S = 0,38 ± 0,13	S = 10,87 ± 3,44	S = 2,30 ± 0,73	S = 2,33 ± 0,74	S = 2,49 ± 0,69	S = 2,21 ± 0,70	S = 1,35 ± 0,43	S = 0,92 ± 0,29	S = 0,48 ± 0,15	S = 0,32 ± 0,10	S = 0,73 ± 0,04	S = 0,37 ± 0,12			
	Mittel	4	270,10	10,89	23,33	0,46	55,44	8,90	7,70	7,90	6,77	4,38	3,17	1,80	1,24	0,42	1,24			

A	Tage vor Therapie nach (+)	Blut-zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn-zucker g	Insulin $\mu\text{E}/\text{ml}$	C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%]									
							$\mu\text{E}/\text{ml}$ kaltes					Insulin				
							0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10^4	$\frac{\text{E}}{2,5 \text{ ml}}$
Pat.																
Herr J.B.	+ 6	$\frac{24,3}{286}$	2,8		$\frac{12,01}{40,56}$	67,0	10,63	9,01	8,41	7,32	4,69	3,55	1,96	1,28	0,95	0,99
Frau A.f.	+ 6	$\frac{314}{157}$	0,4		$\frac{27,94}{58,24}$	58,7	7,06	6,23	5,93	5,06	3,41	3,05	1,99	1,44	0,24	0,77
Frau E.G.	+ 7	$\frac{243}{210}$	3,5		$\frac{46,53}{74,29}$	55,4	6,40	6,06	5,19	4,08	3,51	2,87	1,11	0,78	0,52	1,03
Frau V.G.	+ 5	$\frac{277}{182}$	5,0		$\frac{9,37}{64,09}$	66,7	4,02	3,11	2,75	1,64	1,34	1,00	0,78	0,71	0,32	1,34
Herr A.H.	+ 4	$\frac{102}{86}$	$\emptyset$		$\frac{9,12}{26,50}$	72	9,61	8,09	8,45	6,58	4,80	3,93	1,93	0,99	0,70	0,91
Frau A.H.	+ 6	$\frac{295}{156}$	0,8		$\frac{29,50}{51,15}$	49,5	5,40	5,29	4,63	4,10	3,20	2,21	1,45	0,95	0,14	1,57
Frau K.K.	+ 5	$\frac{262}{291}$	0,5		$\frac{41,53}{67,15}$	$\frac{75}{65(73)}$	$\frac{6,85}{7,80}$	$\frac{6,34}{7,45}$	$\frac{6,08}{6,16}$	$\frac{5,10}{6,22}$	$\frac{3,95}{4,17}$	$\frac{1,99}{3,26}$	$\frac{1,63}{1,77}$	$\frac{1,28}{1,31}$	$\frac{0,51}{0,85}$	$\frac{1,12}{0,75}$
Herr K.Sch.	+ 7	$\frac{171}{133}$	3,2		$\frac{23,86}{41,76}$	79,8	10,14	10,10	8,39	8,26	6,19	4,98	2,34	1,63	0,82	1,08
Herr F.Sch.	+ 5	$\frac{227}{230}$	$\frac{18,5}{212}$		$\frac{52,61}{51,42}$	$\frac{48,7}{83,5}$	$\frac{7,45}{7,31}$	$\frac{6,89}{6,95}$	$\frac{5,86}{5,88}$	$\frac{4,54}{4,98}$	$\frac{3,58}{4,17}$	$\frac{2,45}{2,94}$	$\frac{1,76}{1,84}$	$\frac{1,01}{1,42}$	$\frac{0,90}{0,66}$	$\frac{1,01}{0,93}$
Frau B.W.	+ 5	$\frac{147}{323}$	12,8		$\frac{27,52}{47,58}$	50,8	8,48	7,56	7,17	5,61	4,90	3,39	1,30	1,23	0,59	1,05
Stadtschulz	$\frac{5,037}{\pm 0,34}$	$\frac{5,6797}{\pm 21,49}$	$\frac{8,15}{\pm 2,58}$		$\frac{5,1531}{\pm 4,84}$	$\frac{5,1150}{\pm 3,64}$	$\frac{5,2112}{\pm 0,67}$	$\frac{5,1137}{\pm 0,62}$	$\frac{5,1186}{\pm 0,53}$	$\frac{5,1186}{\pm 0,53}$	$\frac{5,1129}{\pm 0,41}$	$\frac{5,1140}{\pm 0,35}$	$\frac{5,0947}{\pm 0,15}$	$\frac{5,0920}{\pm 0,16}$	$\frac{5,0920}{\pm 0,08}$	$\frac{5,023}{\pm 0,07}$
Stadtschulz	$\frac{5,60}{\pm 0,34}$	$\frac{228,10}{\pm 24,23}$	$\frac{5,51}{\pm 2,58}$		$\frac{28,00}{\pm 4,45}$	$\frac{64,84}{\pm 3,64}$	$\frac{7,59}{\pm 0,67}$	$\frac{6,87}{\pm 0,62}$	$\frac{6,29}{\pm 0,53}$	$\frac{5,27}{\pm 0,41}$	$\frac{4,02}{\pm 0,35}$	$\frac{2,99}{\pm 0,25}$	$\frac{1,63}{\pm 0,15}$	$\frac{1,17}{\pm 0,16}$	$\frac{0,55}{\pm 0,13}$	$\frac{1,08}{\pm 0,07}$

Gruppe A : Umstellung auf Insulin

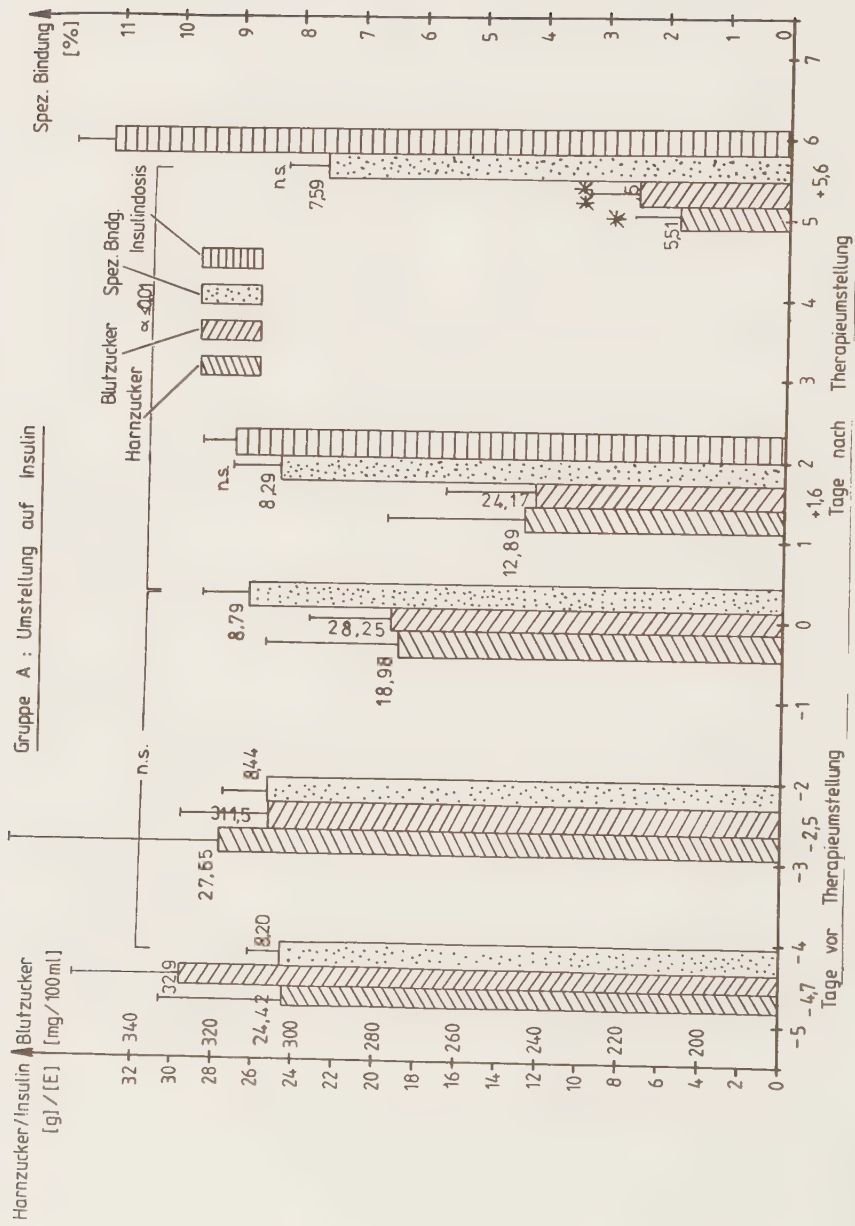


ABB.12: Änderung verschiedener Meßwerte im Verlauf der Therapie

- *Signifikante Änderung gegenüber dem Ausgangswert, ($\alpha < 0.01$)
- **Signifikante Änderung gegenüber dem Ausgangswert, ($\alpha < 0.0025$)
- n.s. Änderung gegenüber Ausgangswert nicht signifikant

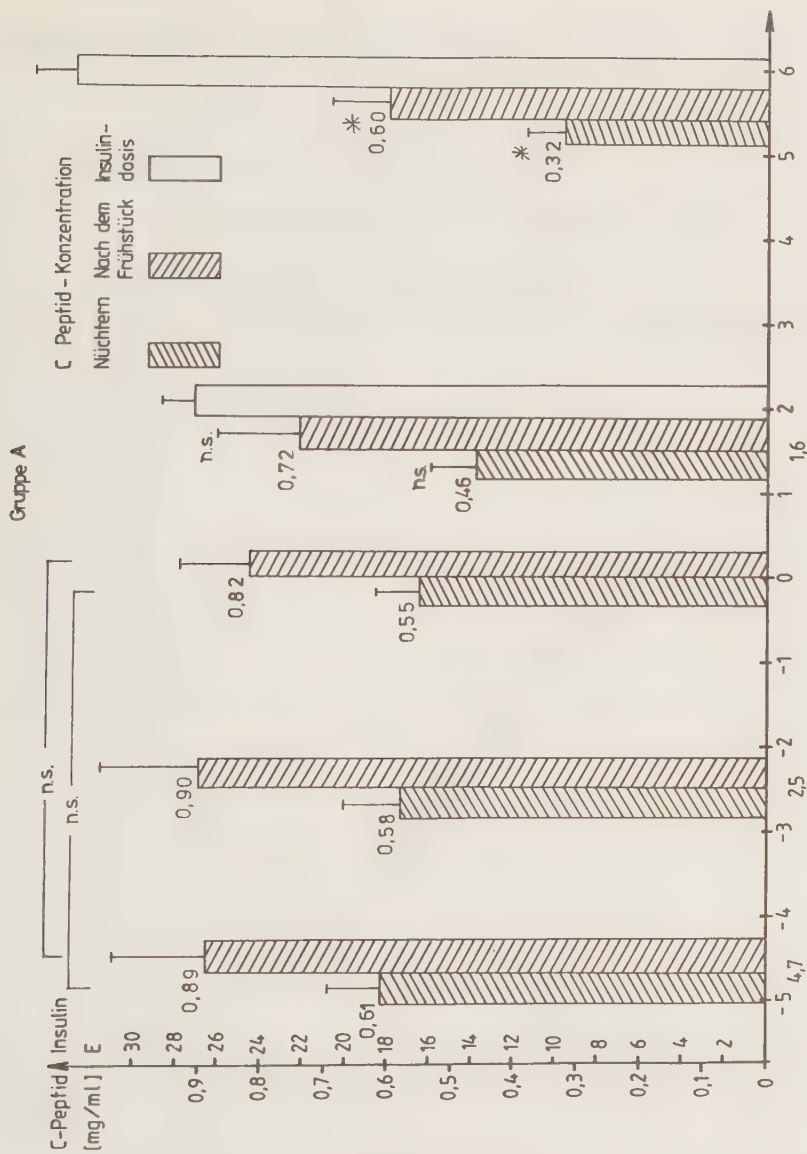


ABB.13: Änderung der C-Peptid-Konzentration im Verlauf der Therapie

* Änderung gegenüber dem Ausgangswert mit $\alpha < 0,01$ signifikant

GRUPPE A:

□ : 4,70 Tage vor der Therapieänderung

○ : am Tag der Therapieänderung

△ : 5,60 Tage nach der Therapieänderung

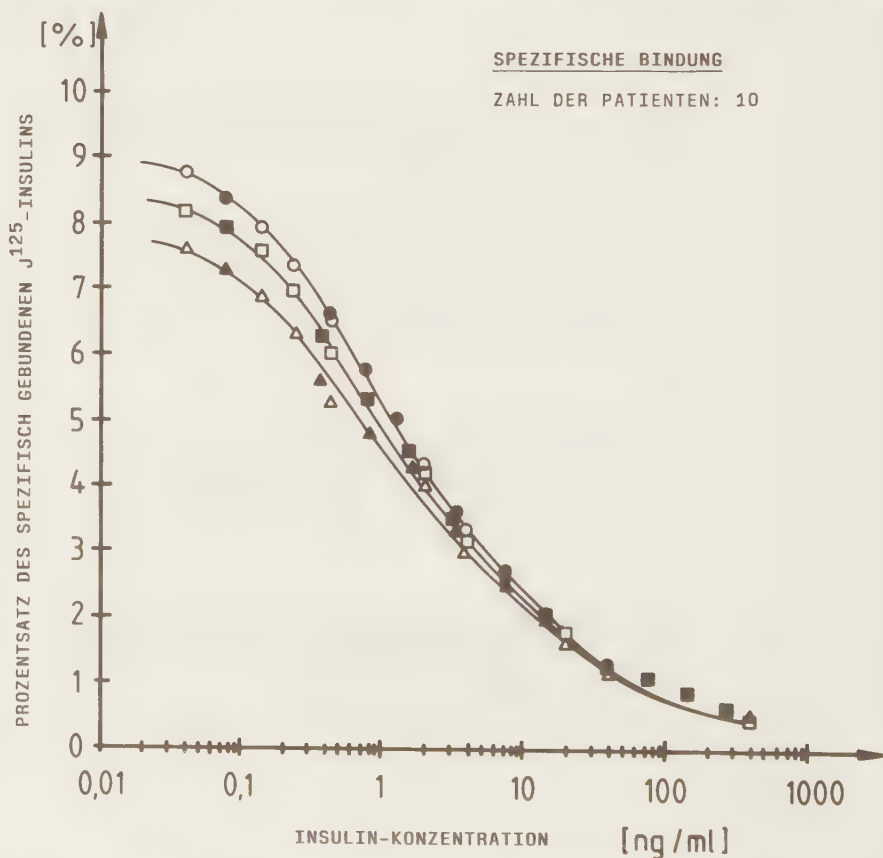


ABB.14: Gruppe A: Spezifische Bindung

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE A:

- : 4,70 Tage vor der Therapieänderung
- : am Tag der Therapieänderung
- △ : 5,60 Tage nach der Therapieänderung

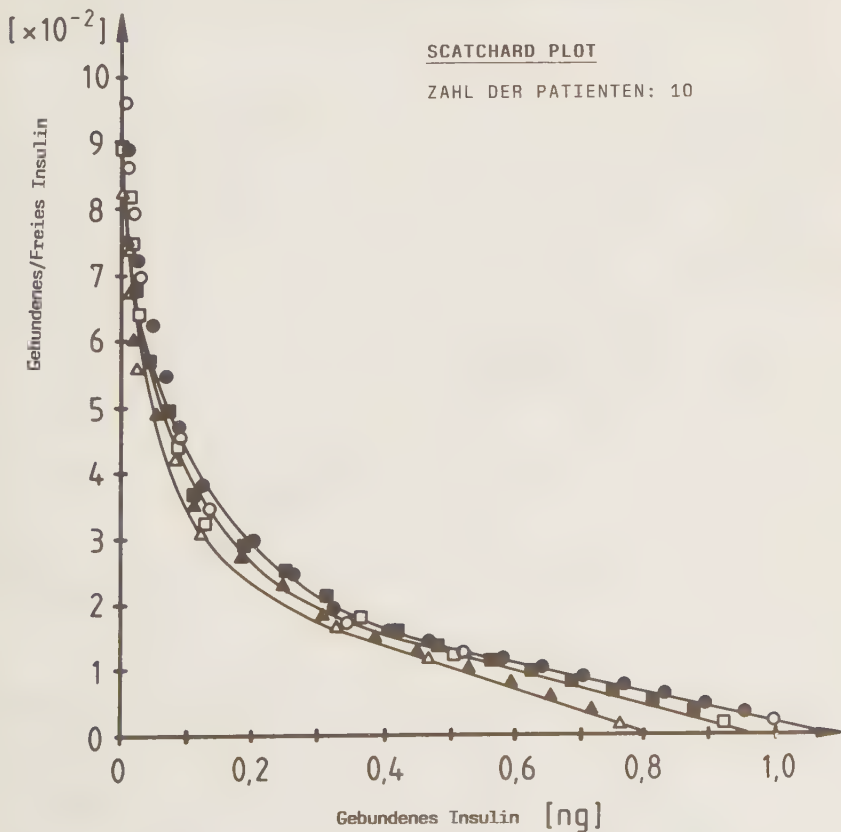


ABB.15: Gruppe A:

Scatchard-Darstellung zur Bestimmung
der Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (●●●) markieren die durch numerische
Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE A:

□ : 4,70 Tage vor der Therapieänderung

○ : am Tag der Therapieänderung

△ : 5,60 Tage nach der Therapieänderung

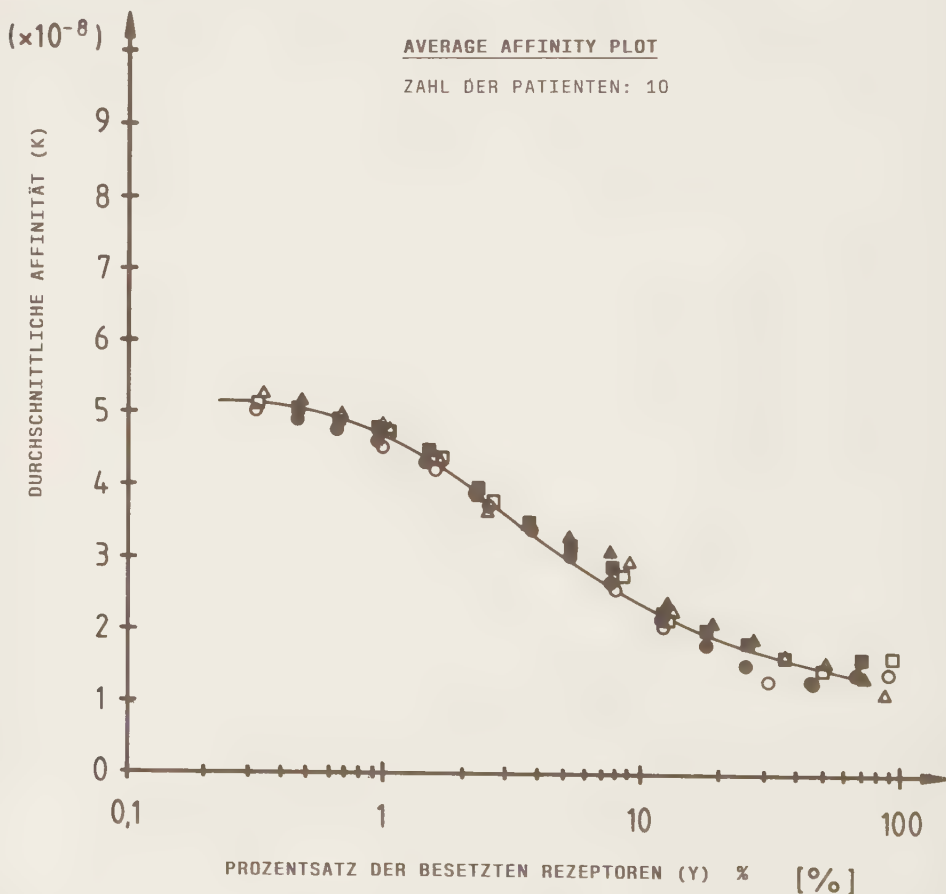


ABB.16: Gruppe A: Bestimmung der Rezeptoraffinität

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

IV.2 GRUPPE B

Umstellung von Glibenclamid auf Insulin + Glibenclamid

Auch die Gruppe B umfaßt 10 Personen, deren nähere Daten in den folgenden Tabellen zusammengefaßt sind.

Diesen Patienten wurde zusätzlich zu drei Tabletten/die Euglucon 5, nachdem damit allein keine ausreichende Stoffwechsellage mehr erzielt werden konnte, noch eine tägliche Insulindosis mit durchschnittlich 12,2 E (am siebten Tag nach Therapieumstellung) verabreicht.

Die **mittlere tägliche Harnzuckerausscheidung** dieser Gruppe betrug am fünften Tag vor der Therapieumstellung 27,04 g, die der Gruppe A 33,52 g. Obwohl dieser Unterschied auf den ersten Blick hoch erscheint, besteht doch zwischen diesen beiden Werten keine signifikante Differenz (t-Test für unverbundene Stichproben - Vergleich zweier Mittelwerte; Zahl der Freiheitsgrade $df = 16$, kritischer Wert t_0 für $p = 0,05$ einseitig: $t_0 = 1,7466$; $t = 0,45 =$ nicht signifikant).

Dies gilt auch für die **mittleren Blutzuckerkonzentrationen** beider Gruppen jeweils 5 Tage vor Therapieumstellung:

Gruppe A: 9.00 Uhr: 340 mg/100 ml; 13.00 Uhr 308 mg/100 ml;
Mittelwert: 324mg/100 ml

Gruppe B: 9.00 Uhr: 294mg/100ml; 13.00 Uhr 302mg/100ml;
Mittelwert: 298mg/100ml

$t = 1,31$; $t_0 = 1,746$; $df = 16$ n.s.

Zwar unterscheiden sich fünf Tage vor der Therapieumstellung beide Gruppen A und B etwas in der Höhe der jeweiligen Plasmaglukose-Konzentrationen und der täglichen Harnzuckerausscheidung, doch ist dieser Unterschied nicht signifikant, so daß beide Gruppen aus derselben Grundgesamtheit entstammen und miteinander verglichen werden können.

In dieser Gruppe B wurde unter der Therapie mit täglich durchschnittlich nur 12,2 E Insulin* und 3x1 Tablette Euglucon 5 eine Verringerung der **Harnzuckerausscheidung** von 27 g/Tag auf 3 g/Tag erzielt (signifikant mit $p < 0,01$).

Auch die Abnahme der **mittleren Plasmaglukose-Konzentration** von 298 mg/ 100 ml am fünften Tag vor der Therapieumstellung (erster Meßtag nach der stationären Aufnahme) auf 205 mg/100ml am siebten Tag nach der Umstellung ist signifikant ($t_0 = 2,821$; $t = 5,15$).

Die erste Messung der **Insulinbindung** erfolgte im Durchschnitt 4,70 Tage vor Therapieumstellung. Die maximale spezifische Bindung betrug dabei 8,26 %: Sie verbesserte sich über 8,55 % (1,2 Tage vor Umstellung), 8,58 % (2,4 Tage nach zusätzlicher Gabe von Insulin) und 8,69% (6,2 Tage nach Umstellung) auf 9,25 % 10,2 Tage nach der Umstellung. Mit der Rangsumme 3 (kritischer Wert: 3 für $p = 0,01$ zweiseitig) kann die Alternativhypothese angenommen werden, d.h. die Erhöhung der Insulinbindung der Erythrozyten während der Therapie ist **kein** Zufallseignis.

Auch während der Gabe von Insulin plus Sulfonylharnstoff hat sich die Insulinbindung signifikant (allerdings nur auf 5%-Niveau, Rangsumme 8, kritischer Wert für $p = 0,05$ zweiseitig: 10) erhöht.

Um die Erhöhung der spezifischen Bindung dieser Gruppe im Gegensatz zur Gruppe A wirklich der Therapie mit Insulin plus Sulfonylharnstoffen zuschreiben zu können und um sicherzustellen, daß nicht auch unterschiedliche Voraussetzungen und Ausgangssituationen eine Rolle spielen, muß die **Gleichheit der beiden Gruppen** zu Beginn des stationären Aufenthalts statistisch belegt werden.

Die maximale Bindung der Gruppe A betrug 4,7 Tage vor der Therapieumstellung im Mittel 8,2%, die der Gruppe B am selben Tag 8,26%. Die beiden Werte sind annähernd gleich, was der Mann-

* Depot Hoechst CR-Insulin

Whitney U-Test mit einer Testgröße $U = 43$ bestätigt (kritischer Wert für $p = 0,02$ zweiseitig: 19).

Unter den beiden Therapien entwickelten sich jedoch die Werte für die maximale spezifische Bindung verschieden:

Die **spezifische Bindung** der Gruppe A sank auf durchschnittlich 7,59 % am 5,6. Tag nach der Therapieumstellung ab, die Bindung der Gruppe B hingegen stieg über 8,69 % am 6,2. Tag auf 9,25 % am 10,2. Tag nach der Umstellung an. Obwohl sich diese Werte vom jeweils letzten Meßtag um 21,9% unterscheiden, ist wegen der großen Streuung der Meßwerte die Differenz nicht signifikant (Testgröße $U = 38$ bei einem kritischen Wert $U_0 = 24$ für $p \leq 0,05$ zweiseitig bzw. für $U_0 = 28$ für $p = 0,05$ einseitig, Mann Whitney U-Test).

Statistisch signifikant belegen läßt sich, daß bei vergleichbarer Ausgangssituation bei gleichzeitiger Gabe von 3x1 Tablette Euglucon 5 weniger als ein Drittel der Insulinmenge ausreicht, um dieselbe Stoffwechseleinstellung zu erzielen (12,2 E Insulin/Tag gegenüber 33,2 E Insulin/Tag).

Bei Therapieende (siebter Tag nach der Therapieumstellung) waren sowohl die **tägliche Harnzuckerausscheidung** mit 3,8 g bzw. 3,3 g ($t = 0,19$ bei $t_0 = 2,1$ für $p = 0,05$ zweiseitig, $df = 18$, t-Test für unverbundene Stichproben) als auch die mittlere Blutglukose-Konzentration mit 207 mg/100ml bzw. 205 mg/ml ($t = 0,08$) bei beiden Gruppen annähernd identisch.

Die drastische Insulineinsparung unter der Kombinationstherapie im Vergleich zur Insulinmenge unter der Insulinmonotherapie ist mit $U = 2,5$ bei einem kritischen Wert von $U_0 = 9$ für $p = 0,001$ zweiseitig, also nur mit der sehr kleinen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % behaftet, signifikant.

Da also bei der Kombinationstherapie signifikant weniger Insulin zugeführt werden mußte, was außerdem ohne jede Ausnahme nur eine Injektion/Tag erforderlich machte, war zu erwarten, daß die erheb-

liche Suppression der Insulin-Eigenproduktion unter der Monotherapie verhindert werden konnte.

Tatsächlich nahmen die **C-Peptid-Spiegel** im Nüchternzustand unter der Therapie nur von 0,72 µg/ml 4,7 Tage vor Therapieumstellung auf 0,65 µg/ml am 10.2. Tag nach der Umstellung ab. Mit einer Rangsumme von 24 bei einem kritischen Wert 3 für $p = 0,01$ zweiseitig kann nach dem Wilcoxon-Paar-Differenz-Test die Nullhypothese nicht verworfen werden, d.h. die C-Peptid-Konzentrationen vor dem Frühstück haben sich unter der Therapie nicht geändert; sie liegen noch, im Gegensatz zu den C-Peptid-Konzentrationen der Gruppe A, im unteren Normbereich.

Dies gilt auch für die **mittleren C-Peptid-Konzentrationen nach dem Frühstück**, die von 0,91 µg/ml 4,7 Tage vor auf 0,95 µg/ul 10,2 Tage nach der Umstellung anstieg. Auch diese Differenz entspricht mit einer Rangsumme von 24,5 nur der statistischen Streuung.

Eine Erklärung dafür, daß bei der Gruppe B im Gegensatz zur Gruppe A die endogene Insulin-Sekretion nicht unterdrückt wird, liefert die Höhe der **Plasmainsulin-Spiegel**: sie steigen unter der Kombinationstherapie mit durchschnittlich 12,2 E nach der Umstellung nicht signifikant (Rangsumme 31 bzw. 30) von 17,09 µE/ml bzw. 27,68 µE/ml auf 30,54 µE/ml (8.00 Uhr bzw. 10.00 Uhr Meßwerte) an.

Damit liegt die 8.00 Uhr (nüchterne) Insulin-Konzentration signifikant unter dem 8.00 Uhr-Wert der Gruppe A (28,00 µE/ml am 5,6. Tag nach der Umstellung, $p < 0,01$ zweiseitig).

Der 10.00 Uhr-Wert der Gruppe B ist zwar mit $U = 27$ nur mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % niedriger als der der Gruppe A (52,27 µE/ml), doch kann auch dieser Wert zumindest als ein weiterer Anhaltspunkt dafür gelten, daß durch die Kombinationstherapie die Empfindlichkeit der Insulinrezeptoren zumindest erhalten bleibt und die erzielte Stoffwechselverbessereung bei der Gruppe B nicht mit erhöhten Plasmainsulinspiegel wie bei der Gruppe A erklärt werden kann.

Die Änderung der Meßwerte unter der Therapie sind wiederum graphisch dargestellt (Abb. 17 und 18).

Die nähere Auswertung der Bindungswerte (Abb.19) mittels des **Scatchard plots** (Abb. 20) ergibt (siehe Formel (6) im Abschnitt III.2.5), daß sich unter der Kombinationstherapie die Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt nicht ändert bzw. im Zweifel sogar von 33 auf 34 Rezeptoren/Erythrozyt erhöht.

Genausowenig wie die Zahl der Rezeptoren wurde unter der Kombinationstherapie deren **Affinität** zu Insulin beeinflusst: im unbesetzten Zustand (weniger als 0,4% der Rezeptoren besetzt), betrug die 'empty sites affinity' $4,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Bei Besetzung von mehr als 30% der Rezeptoren betrug die sogenannte 'filled sites affinity' $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (siehe Abb. 21).

Gruppe B		Alter Dauer	Ist- Ideal- Gew. kg	Größe cm	Triglyzeride mg / 100ml	Cholesterin mg / 100ml	Augenbefund	Zweiterkrankungen	Medikamente	
Pat.	Geschl.								Beginn / Ende	Antidiabetika
Frau K.B.	weibl.	72 15	47 60,2	152	408 mg/dl (279 mg/dl)	310 mg/dl	Cataracta senilis R.d.I.	Herzinsuffizienz b. Hypertonie, Cerebrale Ischämien, Ischialgief. Beschwerden	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H 1x; Isoket ret. 3x; Napresol 4x; Gelusil Tac. 3 x 1.	
Frau S.D.	weibl.	67 10	60,8 60,0	167,5	272 mg/dl (213,189)	244 mg/dl (308,316)	Cataracta senilis	Struma diffusa II Arrhythmia absoluta bei Vorhofflimmern	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H 1x; Isoket ret. 3 x 1 Novodigal mite 1 x 1; Desodril ret. 3 x 1	
Herr L.E.	männl.	71 15	46,0 63,5	150		244 mg/dl	Fundus scleroticus R.d.I.	Apoplektischer Insult mit Hemiparese links, Herzinsuffizienz bei KHE, Jügl. ventriculäre Herzrhythmusstörungen	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H 1x; Isoket ret. 3x; Anturaf 2x; Gelusil-Tac 4x; Tagamet 2 x, Gastrozepam 2x; Fettefettsäure 3 x	
Frau E.E.	weibl.	65 22	51 64,7	158	241 mg/dl (225,188)	333 mg/dl (282,289)	O.B.	Sinusitis max. acuta re.; Herzinsuffizienz bei KHE	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1 x 1; Isoket ret. 3 x 1; Lexotanil 1/2-1/2-1	
Herr G.F.	männl.	57 13	68 76,2	172	236 mg/dl (142 mg/dl)	249 mg/dl (234 mg/dl)	Gefäßbild und Maxilla entsprechend d. Alter Keine R.d.	Depressionen Struma diffusa II bis III	2 - 0 - 2 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H 1x; Isoket ret. (Lithium) 2 1/2 tagl.	
Frau I.H.	weibl.	60 8	60 76,0	170	243 mg/dl	208 mg/dl	Tensio r./l.: 20/20 mm Hg. Sonst o.B.	Pat. leicht erregbar mit Hypertonus und Herzflattern	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H 1x; Isoket ret. 3x; Napresol 4x; Gelusil-Tac 4x; Tagamet 2 x, Gastrozepam 2x; Fettefettsäure 3 x	
Frau F.L.	weibl.	70 1	48 70,3	156	216 mg/dl	164 mg/dl	Hypertonie und sklerotische Gefäßveränderung	Groolecystolithiasis, Nierencyste rechts, Fettleber-megalie	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1x; Dytiide H jeden 2. Tag 1 lab.	
Frau M.Sch.	weibl.	75 13	47 65,7	150	485 mg/dl	275 mg/dl	F.d.II Cataracta senilis arup, Glauk, chronica	Herzinsuffizienz bei Hypertonie u. KHE. Otitis media	2 - 0 - 1 Euglucon 5 1x; Lanitop 1-0-0; Bayconan 1x; Isoket ret. 3x1; Napresol 3x1; Catapresan 150 3x1/2	
Frau A.U.	weibl.	79 10	45 60,4	153	321 mg/dl (161 mg/dl)	193 mg/dl (156 mg/dl)	Altersentsprechender Fundus; Cataracta protracta	Empysembrönditis Herzinsuffizienz bei Hypertonus und koronarer Herzkrankheit	Novodigal 1-0-0; Isoket ret. 1-1-1; Baynol 50 Lasix 1-0-0, Evtl. Nitrospray	
Herr J.D.	männl.	52 11	57 63,0	163	76,0 mg/dl	146 mg/dl	R.d.I.	Linksarterieller Hemiblock 1946 Hepatitis	Alival 25 3 x 1	
S.D.		$s = 84,0$ $\pm 2,66$ $s = 54,3$ $\pm 1,72$	$s = 79,2$ $\pm 2,51$ $s = 61,5$ $\pm 1,75$	$s = 84,0$ $\pm 2,66$ $s = 54,3$ $\pm 1,72$	$s = 1021,53$ $\pm 38,51$ $s = 42,53$ $\pm 1,75$	$s = 63,20$ $\pm 21,88$ $s = 62,11$ $\pm 23,64$				
M. F.		$s = 84,0$ $\pm 2,66$ $s = 54,3$ $\pm 1,72$	$s = 79,2$ $\pm 2,51$ $s = 61,5$ $\pm 1,75$	$s = 84,0$ $\pm 2,66$ $s = 54,3$ $\pm 1,72$	$s = 1021,53$ $\pm 38,51$ $s = 42,53$ $\pm 1,75$	$s = 63,20$ $\pm 21,88$ $s = 62,11$ $\pm 23,64$				
Mittelwerte		11,80	66,00	159,15	263,30 mg/dl (210,80 mg/dl)	246,60 mg/dl (222,70 mg/dl)				

[illegible]

B	Therapie am ... Tage vor Therapieumstellung					Therapie am ... Tage nach Therapieumstellung								
	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8
Pat.						16 E	16 E	16 E	16 E	16 E	16 E	16 E	16 E	16 E
Frau K.B.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau S.D.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Herr L.E.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau E.E.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Herr G.F.	2-0-2	2-0-2	2-0-2	2-0-2	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau I.H.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau F.L.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau M. Sch.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Frau A.U.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
Herr J.D.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
S.D. Mittel-Feld	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1
M.W.	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	2-0-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1	1-1-1

Therapie

Insulin

Euglucon 5

Therapie

Insulin

Euglucon 5

Therapie

Insulin

Euglucon 5

Therapie

Insulin

Euglucon 5

B	Tage vor- nach (4)	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%] µE/ml kaltes Insulin								10 ⁴	500	100	50	10	5	2,5	0	E 2,5 ml
				µE/ml	nüchtern																			
				postprandial	—			0	2,5	5	10	50	100	500	1000									
Pat.		Therapie																						
Frau K.B.	- 4	322 353	52,2	12,52 28,73	0,64 0,68	60,2		6,06	5,78	5,23	4,10	3,41	2,20	1,14	1,11	0,36								1,18
Frau S.D.	- 5	194 285	0,3	16,19 30,94	0,51 0,64	60,5		9,27	8,72	8,09	7,18	5,11	4,55	2,74	1,63	0,70								1,57
Herr L.E.	- 6	300 303	0,5	29,81 44,68	0,74 1,25	63,5		8,18	7,77	6,61	6,05	5,34	3,23	2,31	1,52	0,48								2,12
Frau E.E.	- 5	230 235	0,5	20,15 42,73	0,90 0,80	64,7		9,05	8,68	7,89	7,15	6,02	3,43	1,77	1,64	0,83								1,75
Herr G.F.	- 3	346 306	35,2	4,61 6,43	0,36 0,62	76,2		13,29	11,63	11,39	10,38	6,78	5,42	2,44	2,10	1,09								0,87
Frau I.H.	- 6	293 273	20,9	12,23 29,82	0,45 1,19	76,0		7,24	6,50	6,31	5,69	4,02	3,39	1,34	1,07	0,46								0,87
Frau F.L.	- 5	334 311	6,4	33,60 37,16	1,83 1,75	70,3		7,16	6,70	6,89	6,17	4,15	2,94	1,20	1,04	0,26								1,04
Frau M. Sch.	- 5	310 342	1,0	19,82 19,41	0,75 1,15	65,7		8,38	8,50	7,82	7,62	5,06	3,93	1,84	1,31	0,50								0,82
Frau A.U.	- 5	300 264	26,0	6,34 9,78	0,62 0,40	60,4		7,47	6,34	6,03	5,82	3,55	2,97	2,08	1,48	0,89								1,07
Herr J.D.	- 3	300 350	56	15,66 27,11	0,44 0,60	63		6,45	5,93	5,91	4,77	3,62	3,10	2,44	1,30	0,47								1,61
Sch.B.H.	S = 1,06 ± 0,33	± 16,89 ± 14,73 ± 38,93 ± 12,32	S = 23,85 ± 6,91	S = 9,25 ± 2,92 ± 12,95 ± 4,03	S = 0,42 ± 0,14 S = 0,74 ± 0,14	S = 64,0 ± 1,93		S = 2,05 ± 0,65	S = 1,80 ± 0,57	S = 1,74 ± 0,55	S = 1,74 ± 0,55	S = 1,14 ± 0,36	S = 0,91 ± 0,29	S = 0,57 ± 0,18	S = 0,45 ± 0,14	S = 0,26 ± 0,08								S = 0,44 ± 0,14
M.F.																								
M.W.	- 4,30	222,30 302,20	19,90	17,09 27,68	0,72 0,91	66,05		8,26	7,66	7,22	6,49	4,71	3,52	1,93	1,42	0,60								1,29

B Pat.	Tage vor- nach (4) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%]									
				µE/ml	nüchtern postprandial			µE/ml kaltes Insulin									
								0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	$\frac{E}{25 ml}$
Frau K.B.	+ 7	$\frac{283}{263}$	26,8	$\frac{14,28}{21,23}$	$\frac{0,63}{0,93}$	59,0		6,95	6,43	5,76	4,90	4,05	2,36	1,78	1,29	0,63	1,64
Frau S.D.	+ 7	$\frac{140}{208}$	0	$\frac{21,47}{35,85}$	$\frac{0,70}{0,78}$	60,0		10,00	9,68	9,02	7,21	5,70	5,00	3,05	1,94	0,45	1,98
Herr L.E.	+ 6	$\frac{173}{188}$	Sp.	$\frac{16,74}{31,32}$	$\frac{0,83}{1,13}$	63,5		8,14	7,63	6,95	6,42	5,37	3,87	2,95	1,68	0,62	2,18
Frau E.E.	+ 7	$\frac{250}{211}$	Sp.	$\frac{7,96}{11,28}$	$\frac{0,73}{0,89}$	65,9		9,46	8,91	8,57	7,63	6,95	4,64	2,80	2,01	0,71	2,30
Herr G.F.	+ 6	$\frac{218}{176}$	0	$\frac{5,24}{13,38}$	$\frac{0,44}{0,59}$	76,2		9,31	9,29	8,73	8,17	6,08	4,67	2,23	1,67	0,84	0,67
Frau I.H.	+ 5	$\frac{269}{247}$	0,8	$\frac{11,89}{39,28}$	$\frac{0,52}{1,03}$	75,0		7,26	6,65	5,78	4,96	3,53	2,88	1,33	1,25	0,85	0,60
Frau F.L.	+ 6	$\frac{211}{111}$	0	$\frac{14,06}{31,65}$	$\frac{0,81}{1,28}$	67,9		9,93	8,88	8,58	7,66	5,57	3,93	1,87	1,36	0,72	0,93
Frau M. Sch.	+ 5	$\frac{209}{254}$	0	$\frac{13,25}{55,05}$	$\frac{1,18}{1,73}$	65,5		11,58	10,22	10,16	9,70	8,61	7,98	3,90	1,73	0,69	0,62
Frau A.U.	+ 7	$\frac{229}{281}$	2,2	$\frac{9,56}{15,40}$	$\frac{0,51}{0,57}$	58,7		7,49	6,47	6,11	5,32	4,00	3,22	1,90	1,16	0,41	0,98
Herr J.D.	+ 6	$\frac{250}{212}$	5,6	$\frac{16,25}{22,78}$	$\frac{0,43}{0,72}$	63,0		6,77	6,52	6,08	5,04	3,68	3,28	2,54	1,74	0,71	1,41
S.H.W.	S=0,73 ± 0,25	$\frac{S=43,44}{\pm 13,73}$ $\frac{S=43,83}{\pm 15,76}$	$\frac{S=8,37}{\pm 2,65}$	$\frac{S=4,08}{\pm 4,23}$ $\frac{S=43,62}{\pm 15,31}$	$\frac{S=0,23}{\pm 0,08}$ $\frac{S=0,35}{\pm 0,12}$	$\frac{S=6,44}{\pm 1,94}$		$\frac{S=1,60}{\pm 0,51}$	$\frac{S=1,49}{\pm 0,42}$	$\frac{S=1,64}{\pm 0,51}$	$\frac{S=1,64}{\pm 0,52}$	$\frac{S=1,62}{\pm 0,51}$	$\frac{S=1,58}{\pm 0,50}$	$\frac{S=0,76}{\pm 0,24}$	$\frac{S=0,30}{\pm 0,09}$	$\frac{S=0,74}{\pm 0,05}$	$\frac{S=0,66}{\pm 0,21}$
M.W.	+ 6,20	$\frac{223,20}{245,40}$	3,54	$\frac{13,47}{27,72}$	$\frac{0,68}{0,97}$	65,47		8,69	8,07	7,57	6,70	5,35	4,18	2,44	1,58	0,66	1,33

B Pat.	Tage vor- nach (+) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin µE/ml		C-Peptid ng/ml	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%] µE/ml kaltes Insulin										E 25 ml
				nüchtern	postprandial			0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴		
Frau K.B.	+ 13	$\frac{295}{264}$	12,2	$\frac{15,60}{19,3}$	$\frac{0,63}{0,93}$	59,0		6,95	6,43	5,76	4,90	4,05	2,36	1,78	1,29	0,63	1,64	
Frau S.D.	+ 13	$\frac{185}{148}$	0	$\frac{20,53}{40,91}$	$\frac{0,69}{0,71}$	59,3		9,41	9,01	8,66	7,33	5,21	4,47	2,83	1,65	0,64	2,37	
Herr L.E.	+ 14	$\frac{73}{88}$	0	$\frac{55,47}{37,71}$	$\frac{0,85}{1,30}$	63,5		9,83	9,22	8,46	7,30	6,12	4,21	2,99	2,02	0,71	1,62	
Frau E.E.	+ 11	$\frac{151}{182}$	Sp.	$\frac{8,02}{14,3}$	$\frac{0,64}{0,65}$	64,7		9,39	8,67	8,42	7,51	6,82	4,66	2,74	1,79	0,84	1,43	
Herr G.F.	+ 8	$\frac{209}{132}$	1,2	$\frac{4,30}{15,13}$	$\frac{0,39}{0,50}$	76,2		16,46	15,25	14,74	13,00	8,90	6,60	2,61	1,76	0,51	0,80	
Frau I.H.	+ 8	$\frac{210}{216}$	0,9	$\frac{9,72}{27,69}$	$\frac{0,33}{0,85}$	75		6,98	6,23	5,96	5,60	3,92	2,62	1,31	1,11	0,84	1,40	
Frau F.L.	+ 6	$\frac{211}{111}$	0	$\frac{12,07}{22,56}$	$\frac{0,81}{1,28}$	67,9		9,93	8,88	8,58	7,66	5,57	3,93	1,87	1,36	0,72	0,93	
Frau M. Sch.	+ 16	$\frac{222}{226}$	0	$\frac{18,73}{38,34}$	$\frac{1,18}{1,73}$	65,6		9,31	6,80	6,39	5,94	4,54	3,77	2,39	1,47	1,05	0,65	
Frau A.U.	+ 7	$\frac{229}{281}$	2,2	$\frac{8,63}{30,37}$	$\frac{0,53}{0,84}$	58,7		7,49	6,47	6,11	5,32	4,00	3,22	1,90	1,16	0,41	0,98	
Herr J.D.	+ 6	$\frac{250}{212}$	5,6	$\frac{18,29}{59,10}$	$\frac{0,43}{0,72}$	63		6,77	6,52	6,08	5,04	3,68	3,28	2,54	1,74	0,71	1,41	
Ci. P8W.	S=3,65 ± 4,15	$\frac{S=3,92}{\pm 4,24}$	$\frac{S=3,92}{\pm 4,24}$	$\frac{S=14,48}{\pm 4,58}$	$\frac{S=0,25}{\pm 0,08}$	$\frac{S=6,92}{\pm 1,97}$	$\frac{S=6,92}{\pm 1,97}$	$\frac{S=2,84}{\pm 0,30}$	$\frac{S=2,72}{\pm 0,86}$	$\frac{S=2,70}{\pm 0,85}$	$\frac{S=2,38}{\pm 0,75}$	$\frac{S=1,65}{\pm 0,52}$	$\frac{S=1,21}{\pm 0,38}$	$\frac{S=0,55}{\pm 0,17}$	$\frac{S=0,30}{\pm 0,10}$	$\frac{S=0,18}{\pm 0,06}$	$\frac{S=0,51}{\pm 0,16}$	
M.F.		$\frac{S=6,28}{\pm 20,52}$		$\frac{S=13,88}{\pm 4,33}$	$\frac{S=0,33}{\pm 0,10}$													
M.W.	+ 10,20	$\frac{203,50}{186,00}$	2,21	$\frac{12,14}{30,54}$	$\frac{0,65}{0,95}$	65,29		9,25	8,35	7,92	6,96	5,28	3,91	2,30	1,54	0,74	1,32	

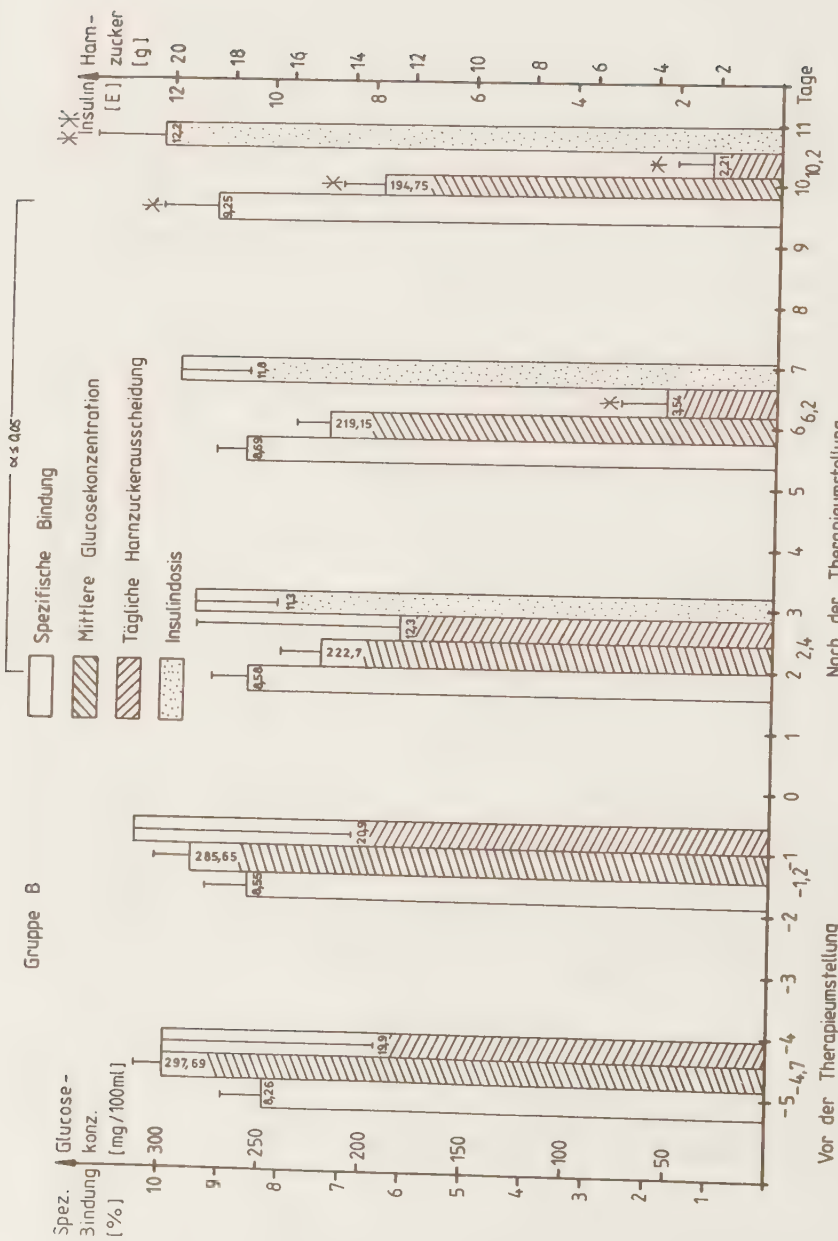


Abb. 17: Änderung der klinischen Parameter der Gruppe B unter der Therapie Insulin plus Glibenclamid

*Signifikant mit $\alpha \leq 0,01$ gegenüber Ausgangswerten vor Therapieumstellung
 **Signifikant geringe Insulinmenge ($\alpha \leq 0,001$) gegenüber Gruppe A bei vergleichbarer Stoffwechseleinstellung

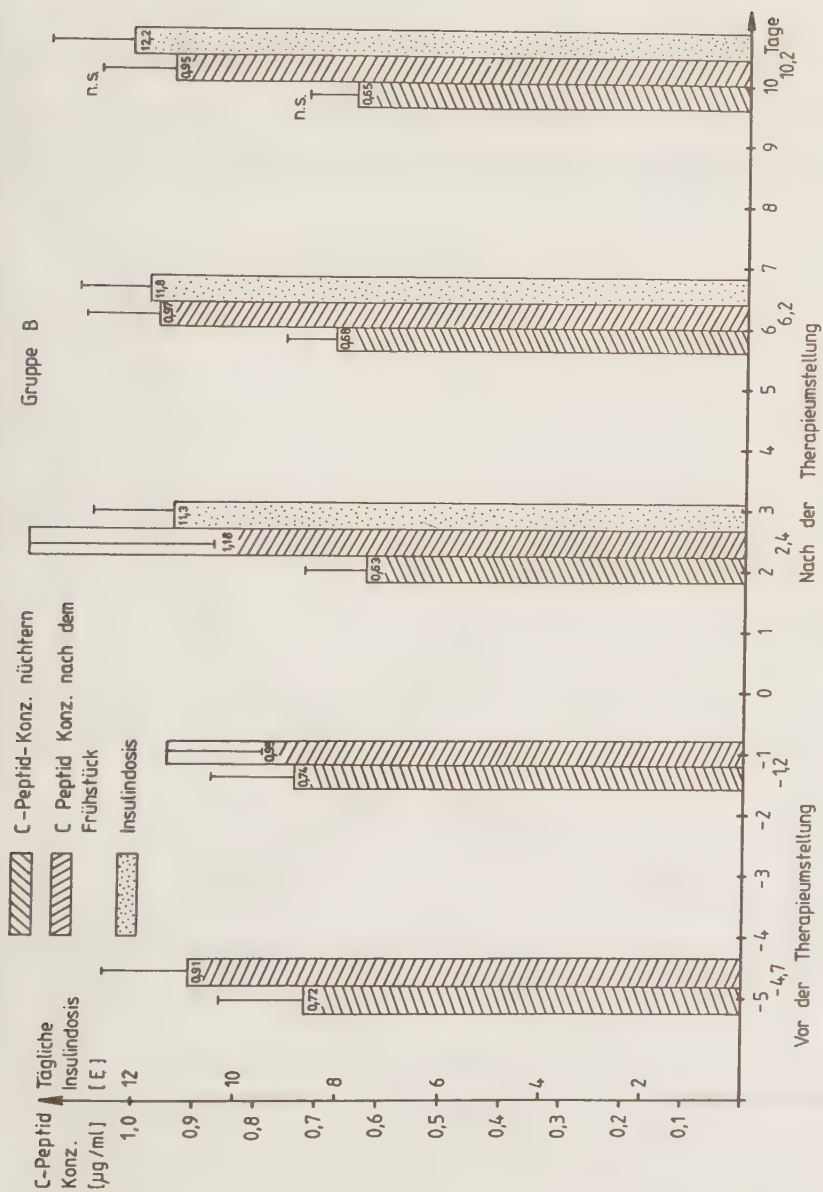


ABB.18: Änderung der klinischen Parameter der Gruppe B unter der Therapie Insulin plus Glibenclamid

GRUPPE B:

- : 4,70 Tage vor der Therapieänderung
 ○ : 2,40 Tage nach der Therapieänderung
 △ : 10,20 Tage nach der Therapieänderung

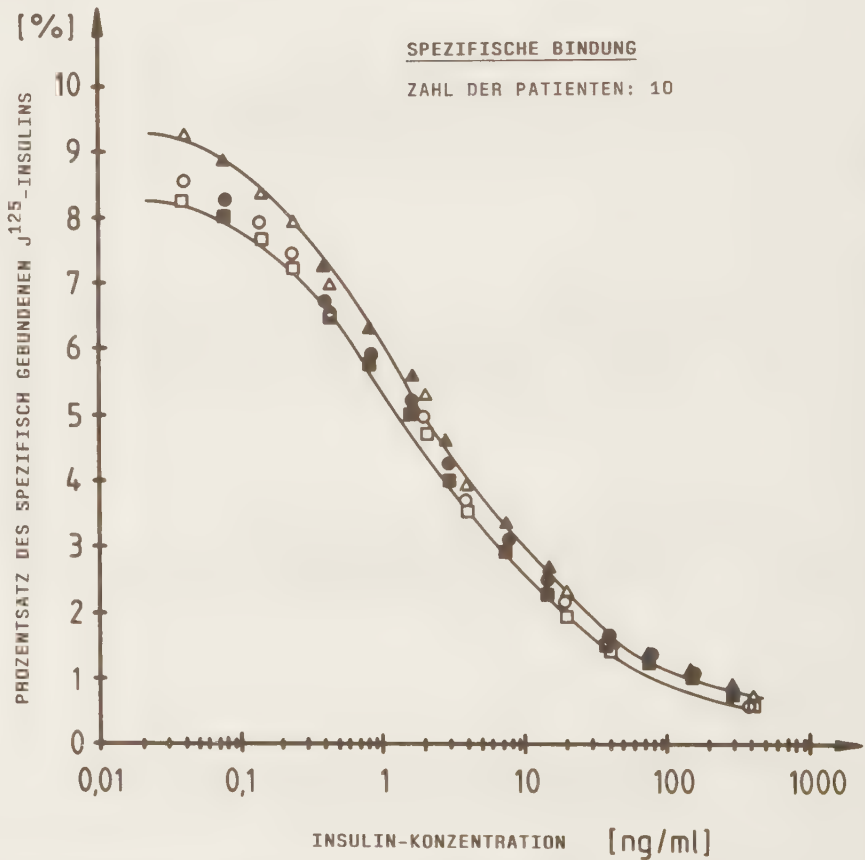


ABB.19: Gruppe B: Spezifische Bindung

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE B:

□ : 4,70 Tage vor der Therapieänderung

○ : 2,40 Tage nach der Therapieänderung

△ : 10,20 Tage nach der Therapieänderung

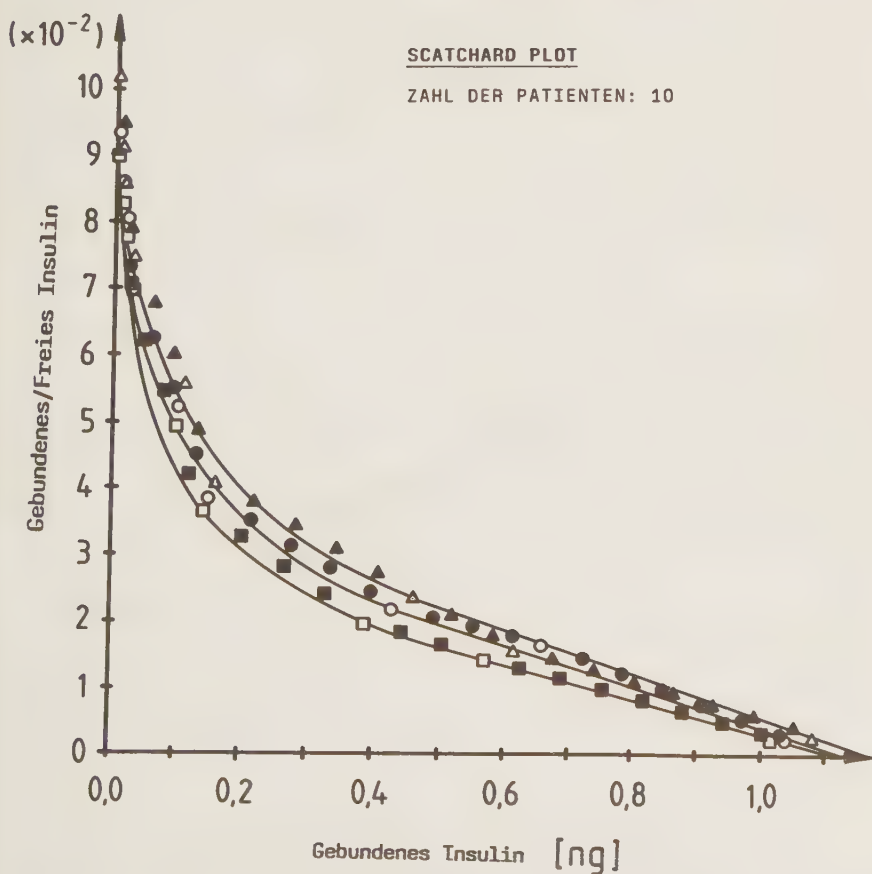


ABB:20: Gruppe B: | Scatchard-Darstellung zur Bestimmung der Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE B:

□ : 4,70 Tage vor der Therapieänderung

○ : 2,40 Tage nach der Therapieänderung

△ : 10,20 Tage nach der Therapieänderung

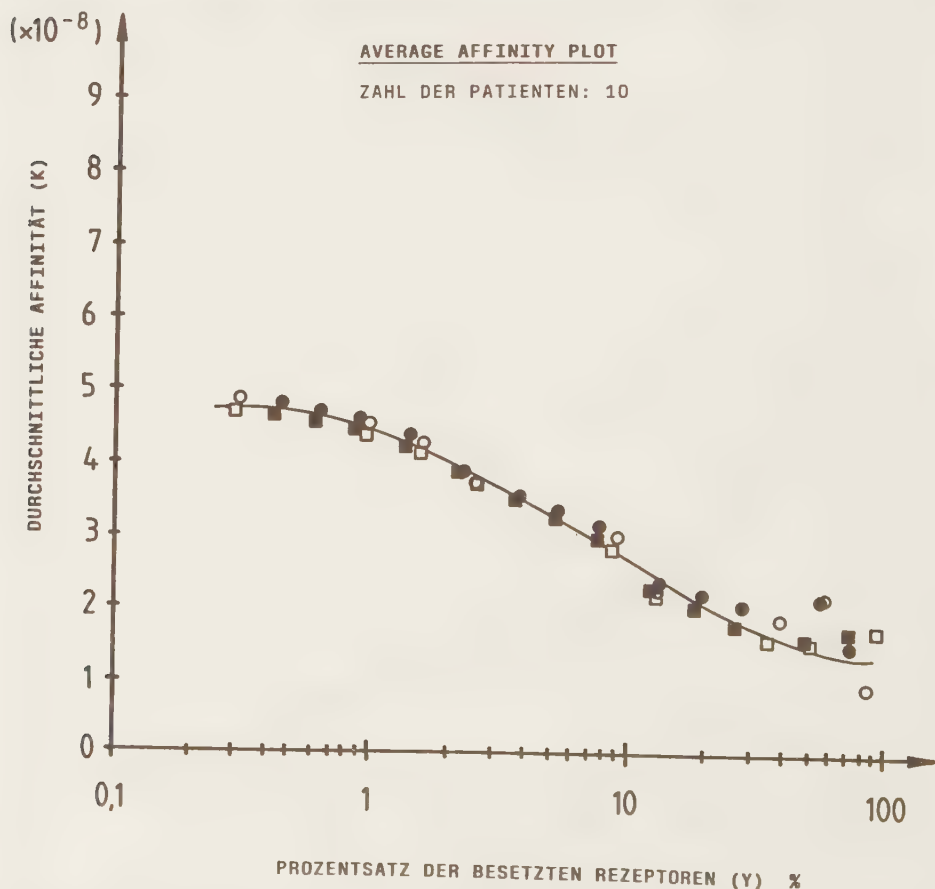


ABB.21: Gruppe B: Bestimmung der Rezeptoraffinität

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

IV.3 GRUPPE C

Umstellung von der Insulinmonotherapie auf die Kombinations- therapie Insulin plus Glibenclamid

Die Gruppe C setzte sich aus 9 Patienten zusammen, die trotz einer täglichen Insulindosis von durchschnittlich mehr als 90 E eine mittlere Plasmaglukose-Konzentration von 269 mg/100 ml bei einer Harnzuckerausscheidung von 15,4 g/Tag aufwiesen.

Hypoglykämien konnten dabei durch engmaschige Blutzuckerkontrollen ausgeschlossen werden.

Es sollte wiederum die Hypothese überprüft werden, ob die Kombinationstherapie aus Insulin plus Glibenclamid bei insulinpflichtigen Typ II-Diabetikern das Bindungsverhalten der Insulinrezeptoren positiv beeinflußt und damit die Wirksamkeit des Insulins verbessert. Hierdurch sollte mit weniger Insulin eine verbesserte Stoffwechseleinstellung erzielt werden können.

Während die Patienten der Gruppe C am fünften Tag vor der Umstellung noch durchschnittlich 92,2 E/Tag, am Tag vor der Therapieänderung sogar 94,2 E benötigten, sank der **Insulinbedarf** bei gleichzeitiger Gabe von 3x1 Tablette Euglucon 5 pro Tag über 52,6 E am 5. Tag auf weniger als die Hälfte, nämlich 44,6 E am 7. Tag nach der Umstellung. Nach dem Wilcoxon-Paar-Differenzen-Test ist dieser Rückgang des Insulinbedarfs mit $p = 0,01$ signifikant (Rangsumme am 4. und 7. Tag nach Umstellung: 0; kritischer Wert für $p = 0,01$ zweiseitig: 1).

Die tägliche **Harnzuckerausscheidung** nahm unter dieser Therapie von 15,4 g am 5. Tag vor auf 8,5 g am 7. Tag nach der Umstellung schwach signifikant ab (t-Test: $t = 1,62$, $t_0 = 1,397$ für $p = 0,2$ zweiseitig).

Wie aus dem entsprechenden Meßprotokoll hervorgeht, war die **Glukoseausscheidung** am Tag der Umstellung mit 3,0 g am niedrigsten, um am vierten Tag nach der Umstellung 6,67 g, am siebten Tag 8,56 g zu betragen.

Eine Erklärung für diese Verschlechterung der Diabeteseinstellung ist, daß durch die exzessive, im Trend langsam steigende Dosierung von Insulin schon vor der Umstellung eine signifikante Reduktion der Zuckerausscheidung erreicht wurde, die jedoch nach der drastischen Insulinreduktion um 21 % bzw. 30 % am Tag der Therapieumstellung bzw. am Tag danach deutlich anstieg, um danach trotz weiterer Reduktion der Insulindosen, langsam wieder bis auf 4,36 g am 11,9. Tag abzusinken. Während die Reduktion der täglichen Zuckerausscheidung am siebten Tag nach der Umstellung mit $t = 1,62$ nur mit sehr niedriger Wahrscheinlichkeit signifikant war ($t_0 = 1,397$ für $p = 0,20$ zweiseitig), war die am vierten bzw. 11,9. Tag nach der Umstellung gemessene Stoffwechselverbesserung, die mit etwas höheren Insulindosen erzielt wurde, statistisch signifikant: $t = 3,03$ (vierter Tag) bzw. $t = 3,19$ (11,9. Tag nach der Umstellung) mit $t_0 = 2,896$ für $\alpha = 0,02$ zweiseitig.

Die Auswertung der **mittleren Plasmaglukosespiegel** liefert prinzipiell gleiche Ergebnisse: der leichte Rückgang der Glukose-Konzentration unter der Kombinationstherapie, wiederum gemessen an den beiden Stichtagen (fünfter Tag mit 269 mg pro 100ml Plasmaglukose vor und siebter Tag mit 245 mg/100ml nach der Umstellung) ist mit $t = 1,07$ nicht signifikant. Werden Stichtage herangezogen, an denen die Patienten etwas höhere Insulindosen erhielten, war der Rückgang mit $t = 1,87$ (4. Tag nach der Umstellung: Glukose-Konzentration 227 mg/100ml bzw. am 11,89. Tag mit 228 mg/100 ml bei $t_0 = 1,859$ für $p = 0,1$ zweiseitig signifikant).

Die **spezifische Bindung** dieser schon vor der stationären Einweisung insulinpflichtigen Patienten der Gruppe C betrug am 4. Tag vor der Umstellung im Mittel 5,56 %. Bei einer Kontrollmessung 0,78 Tage vor der Umstellung stieg dieser Wert nicht signifikant auf 6,29 % an. Die nach der Umstellung auf die Kombinationstherapie an allen weiteren Stichtagen gemessenen spezifischen Bindungen waren signifikant bis auf 9,71 % am 11,89. Tag angestiegen ($p < 0,01$ zweiseitig).

Ein Vergleich mit den entsprechenden Bindungswerten der Gruppe B

zeigt, daß zum jeweils frühesten Stichtag vor der Therapieänderung ein signifikanter Unterschied in der Höhe der spezifischen Bindung bestand. Bei der Gruppe C betrug die spezifische Bindung am 4. Tag 5,56 % bei 91,78 E Insulin, bei der Gruppe B hingegen am 4,7. Tag vor Umstellung 8,26 %. Nach dem Mann-Whitney-Test ist mit einer Testsumme $U = 13$ und einem kritischen Wert $t_0 = 14$ für $p = 0,01$ zweiseitig diese Differenz signifikant. Unter der jeweiligen Kombinationstherapie glichen sich die spezifischen Bindungen mit 9,71 % (Gruppe C am 11,89. Tag) bzw. 9,25 % (Gruppe B am 10,2. Tag) einander an. Die bestehende Differenz ist nicht signifikant, sondern ein Zufallsergebnis ($U = 43$, $U_0 = 33$ für $p = 0,2$ zweiseitig n.s.).

Allerdings waren die Patienten der Gruppe B am siebten Tag nach der Umstellung, zumindest den Zahlenwerten nach, besser als die Gruppe C eingestellt:

	Gruppe B:	Gruppe C:
Harnzucker:	3,3 g/Tag	8,5 g/Tag
Glukose-Konzentration:	205 mg/100 ml	245 mg/100 ml

Der t-Test für unverbundene Stichproben liefert mit $t = 1,25$ (Harnzucker) und $t = 1,69$ (Glukose-Konzentration) bei $t_0 = 1,333$ für $p = 0,2$ zweiseitig zumindest Anhaltspunkte dafür, daß diese Werte nicht derselben Grundgesamtheit entstammen.

Der Grund dafür könnte wiederum sein, daß bei den Patienten der Gruppe C das benötigte Insulin etwas unterdosiert war, was eine hohe spezifische Bindung, jedoch auch eine insgesamt unbefriedigende Stoffwechseleinstellung zur Folge hatte. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß die entsprechenden Stoffwechselparameter bei beiden Gruppen am vierten Tag nach der Umstellung, als die Gruppe C noch durchschnittlich 44,56 E Insulin erhielt, annähernd gleich waren:

Glukose-Konzentration:	215 mg/ml	: 227 mg/ml
	$t = 0,37;$	
Harnzuckerausscheidung:	7,8 g/Tag	: 6,5 g/Tag
	$t = 0,18$	
	jeweils Gruppe B : C.	

Auch zum letzten Meßtag, dem 10,2. Tag nach der Umstellung bei der Gruppe B, dem 11,89. Tag bei der Gruppe C, hatten sich die entsprechenden Werte unter bzw. infolge einer leichten Erhöhung der Insulindosis bei der Gruppe C bei insgesamt verbesserter Stoffwechsellaage wieder einander genähert:

Plasmaglukose:	195 mg/100 ml	: 213 mg/100 ml
	$t = 0,82$	
Harnzucker:	2,1 g/Tag	: 4,2 g/Tag
	$t = 0,85.$	

Unter der Kombinationsbehandlung mit Insulin plus Euglucon 5 war bei signifikant geringerem **Insulinbedarf** die **spezifische Insulinbindung** der Erythrozyten signifikant gestiegen. Der Zusammenhang zwischen beiden Meßwerten wurde mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten r_s überprüft. Die Korrelation zwischen der Abnahme des täglichen Insulinbedarfs vom 4. Tag vor bis zum 5. Tag nach der Umstellung und der Zunahme der spezifischen Bindung im gleichen Zeitraum beträgt $r_s = 0,6$.

Da der kritische Wert $r_o = 0,6$ für $p = 0,05$ einseitig beträgt, ist dieser Test ein weiteres Indiz dafür, daß zwischen den beiden Parametern : **Tägliche Insulindosis - spezifische Insulinbindung** ein Zusammenhang besteht.

Die exzessive Gabe von Insulin vor der Therapieumstellung (91,78 E am vierten Tag vor der Umstellung) mußte sich auf die endogene Insulinproduktion auswirken. Tatsächlich betrug die mittlere, um 8.00 Uhr (nüchtern und vor der Insulininjektion) gemessene **Plasma-C-Peptid-Konzentration** an diesem Tag nur 0,67 µg/µl. Bis zum 11,89. Tag nach der Umstellung auf die Kombinationstherapie stieg die C- **Peptid-Konzentration** auf durchschnittlich 1,10 µg/µl an. Mit

der Rangsumme 0 ist dieser Anstieg nach dem Wilcoxon-Paar-Differenzen-Test auf dem Niveau $p = 0,01$ zweiseitig signifikant.

Auch die **nach dem Frühstück** gemessenen **C-Peptid-Spiegel** stiegen in diesem Zeitraum von $1,17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ auf $1,58 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ an. Mit einer Rangsumme 7 bei einem kritischen Wert 8 für $p = 0,10$ zweiseitig ist auch die durch diesen Anstieg der C-Peptid-Konzentration eindeutig bestimmte Erhöhung der endogenen Insulinsekretion signifikant.

Eine Korrelation zwischen der Höhe der **Insulindosis** und der **C-Peptid-Konzentration** konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient $r_s = 0,12$ bzw. $0,40$ postprandial).

Der Grund dafür liegt unter anderem in den großen Standardabweichungen sowohl bei den C-Peptid-Messungen (Bereich $0,37-1,61 \text{mg}/\text{ml}$) als auch bei der täglich benötigten Insulinmenge (Bereich 72-108 E).

Ein weiterer, vorerst noch hypothetischer Grund für die fehlende Korrelation könnte darin liegen, daß bei den Patienten der Gruppe C ausschließlich ein Defekt auf Rezeptorebene bzw. in den sich daran anschließenden Stoffwechselschritten und nicht ausschließlich eine verminderte Sekretionsleistung der Inselzellen, die ja trotz Zufuhr von Insulin maximal produzieren, besteht.

Es fällt ja auf, daß trotz der enormen Insulinzufuhr und der daraus resultierenden hohen Plasmainsulinspiegel die noch vorhandene endogene Insulinproduktion nicht vermindert zu sein scheint. Da diese Gruppe jedoch zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes mehr als die doppelte physiologischerweise produzierte Insulinmenge, am Ende der Therapie immerhin noch eben die physiologische Tagesproduktion erhält, ohne daß eine zufriedenstellende Einstellung erzielt wird, kann der vorliegende Diabetes zumindest nicht mit einem Insulinmangel erklärt werden. Vielleicht produziert das endokrine System dieser Patienten trotz hoher Plasmainsulinspiegel noch normal, wie das vorliegende Ergebnis anzeigt und für den exzessiven Insulinbedarf sind ganz andere Störungen, die noch näher erforscht werden müssen, verantwortlich.

Als weiterer Meßparameter wurde noch der **freie Plasmainsulinspiegel** erfaßt. Er war am vierten Tag vor der Umstellung um 8.00 Uhr mit durchschnittlich 51,72 $\mu\text{E/ml}$, um 10.00 Uhr, also nach dem Frühstück und nach der morgendlichen Insulininjektion von durchschnittlich 60,89 E mit 109,46 $\mu\text{E/ml}$ pathologisch hoch (Normalwerte: Basal $11 \pm 5 \mu\text{E/ml}$, nach Belastung mit 100 g Glukose $103 \pm 68 \mu\text{E/ml}$). 11,89 Tage nach der Umstellung gingen die betreffenden Insulin-Konzentrationen auf normale Werte (33,12 $\mu\text{E/ml}$ bzw. 62,12 $\mu\text{E/ml}$) zurück. Dieser Rückgang, wiewohl dem Zahlenwert nach beträchtlich, ist mit der Rangsumme 16 bzw. 13 statistisch nicht signifikant.

Dennoch kann aus dem numerischen Rückgang bzw. der statistischen Konstanz der Plasmainsulinspiegel abgeleitet werden, daß die erzielte Stoffwechselverbesserung unter der Kombinationstherapie nicht durch eine Erhöhung der Insulin-Konzentration, sondern durch eine Erhöhung der Insulinwirkung, d.h. durch eine Änderung am Insulinrezeptor erzielt worden ist.

Der Verlauf der wichtigsten Meßwerte unter der Therapie ist in den Abb. 22 und 23 graphisch dargestellt.

Aus dem Scatchard-plot (Abb. 25) bzw. aus dessen Schnittpunkt mit der x-Achse läßt sich mittels Formel (6) aus Abschnitt III.2.5 die **Zahl der Rezeptoren** berechnen. Diese nahm unter der Kombinationstherapie von 21 um fast 60% auf 33 zu.

Unter der Kombinationstherapie erhöhte sich also die unter den exzessiven Insulindosen bzw. die unter den pathologisch erhöhten Plasmainsulinspiegeln stark verringerte Zahl der Insulinrezeptoren um mehr als die Hälfte.

Die '**empty sites affinity**', die direkt dem 'average affinity plot' (Abb. 26) entnommen werden kann, betrug vor der Therapieumstellung $5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Unter der Kombinationstherapie nahm die **Affinität der unbesetzten Rezeptoren** auf $5,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zu. Ob diese Änderung signifikant ist, läßt sich bei der großen Fehlerbreite, mit

der die graphischen Auswerteverfahren behaftet sind (siehe Kapitel VI) nicht beurteilen.

Eine Erhöhung der Affinität unter der veränderten Therapie zeigten die Rezeptoren auch im besetzten Zustand: die **'filled sites affinity'** nahm von $2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ auf $2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zu.

Eine nähere Auswertung des 'average affinity plots' ergibt weiter, daß unter der Kombinationstherapie demnach die ursprüngliche Affinität linear, also unabhängig von der Rezeptorbesetzung, um $0,6-0,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zunahm.

Eine Erklärung für diese Zunahme der Affinität könnte sein, daß die unter der Kombinationstherapie neugebildeten Rezeptoren eine insgesamt etwas höhere Affinität als die alte Rezeptorpopulation besitzt. Denn da ja die Zahl der Rezeptoren unter der Kombinations-therapie um mehr als 50 % zunahm, würde sich bei einer Affinität der neugebildeten Rezeptoren von $K_e = 6,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ im unbesetzten und von $K_f = 3,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ im besetzten Zustand die gemessene Durchschnittsaffinität ergeben.

C	Pat.	Geschl.	Alter Diab. Dauer	Ist- Ideal- Gew. kp	Größe cm	Triglyzeride mg / 100ml	Cholesterin mg / 100ml	Augenbefund	Zweiterkrankungen	Medikamente		
										Beginn / Ende	Antidiabetika	Sonstige
	Frau O.B.	weibl.	— —	65 —	71,4 60	170	222 mg/dl	Fundus hypertonicus I	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie	64/32 in Ruhe 5/10-8 E. 2x1 Hox CR Euglucom 5 8 E. 2x1 Hox 1-1-1 60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi- Periphere Makroangiopathie Stad. II., Hypertonie, kom- pensierte Herzinsuffizienz Herzinsuffizienz bei Hyper- tonie und v.a. koronarer Herz- erkrankung fett Lebererkrankung, kompensier- te Herzinsuffizienz bei Hyper- tonie Hypertonie, Euthyreose Stru- maphysa mit kalten Knoten Chronisch persistierende Hepatitis, Z.n. Ablatio nom. Diab. Polynuropathie, Herz- insuffizienz bei Hypertonie, Periphe- re Makroangiopathie, Stru- maphysa mit kalten Knoten Hyperlipidämie, Herzinsuffi- zienz bei Hypertonie, Stru- maphysa mit kalten Knoten Apoplex mit Hemiparese	
	Frau E.F.	weibl.	— —	63 —	58,7 47	154	209 mg/dl	Retinopathia diabeti- ca II	Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau A.S.	weibl.	— —	61 —	76,3 53,3	163	364 mg/dl (306 mg/dl)	Fundus hypertonicus et diabeticus I-II	Periphere Makroangiopathie Stad. II., Hypertonie, kom- pensierte Herzinsuffizienz	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau U.S.	weibl.	— —	68 —	75,4 —	167	233 mg/dl	Fundus sklerotici sonst O.B.	Herzinsuffizienz bei Hyper- tonie und v.a. koronarer Herz- erkrankung	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau M.M.	weibl.	— —	68 —	79,0 55	165	681 mg/dl (399 mg/dl)	Retinopathia diabeti- ca II	Hypertonie, Euthyreose Stru- maphysa mit kalten Knoten	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau A.P.	weibl.	— —	73 —	45,5 —	150	225 mg/dl	Retinopathia diabeti- ca II	Hypertonie, Euthyreose Stru- maphysa mit kalten Knoten	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau M. Sch.	weibl.	— —	49 —	53 —	160	267 mg/dl	Regelrechtlicher Augenbe- fund	Chronisch persistierende Hepatitis, Z.n. Ablatio nom.	60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau E.R.	weibl.	— —	64 —	66,7 55	165,5	239 mg/dl (208 mg/dl)	Bds. Aphakie nach Ca- taractextraktion Retinopathia diabeti- ca II	Diab. Polynuropathie, Herz- insuffizienz bei Hypertonie, Periphe- re Makroangiopathie, Stru- maphysa mit kalten Knoten Hyperlipidämie, Herzinsuffi- zienz bei Hypertonie, Stru- maphysa mit kalten Knoten Apoplex mit Hemiparese	64/32 in Ruhe 5/10-8 E. 2x1 Hox CR Euglucom 5 8 E. 2x1 Hox 1-1-1 60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	Frau G.H.	weibl.	— —	66 —	70,6 55	161	491 mg/dl (240 mg/dl)	Netz- und Adenahut- sklerose.	Hyperlipidämie, Herzinsuffi- zienz bei Hypertonie, Stru- maphysa mit kalten Knoten Apoplex mit Hemiparese	64/32 in Ruhe 5/10-8 E. 2x1 Hox CR Euglucom 5 8 E. 2x1 Hox 1-1-1 60/10/36 E in Ruhe 60/24 E 2x1 Hox CR 1-1-1 Euglucom 100 26 E 2x1 Hox Euglucom 300 7/2/36 E 2x1 Hox 30/12 E 2x1 Hox 40/14 E 2x1 Hox 34/16 E 2x1 Hox 5/2 E 0-0-18 E 2 E 2x1 Hox 36 E 0-16 E 2x1 Hox Euglucom 56/16 blutet 58/34 E 2x1 Hox 5/2 E 2x1 Hox Diagnostik 2x1 Hox 58/24 E 2x1 Hox max. 60/60, max. 54/24 32/12 Diastol. 2x1 Hox 1-1-1 Euglucom 5	Herzinsuffizienz bei koronarer Herzkrankung Coronar- vaskuläre Insuffizienz, Hypertonie Z.n. Striktomie urogenital- infarkt, kompensierte Herz- insuffizienz bei KHK, Adipositi-	
	S. D.		— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	M. F.		— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	Mittel- werte		— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —

Tage vor Therapieumstellung

Tag der Therapieumstellung

Tage nach Therapieumstellung

C

Pat	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
Frau Dn.B.	64	64	68	68	68	54 Dep.H.	54	44	36	28	24	24	20
Frau E.F.	30	32	32	32	32	24 E	16	16	8	8	0	0	0
	60	60	60	60	60	48	48	38	38	30	30	30	30
	20	20	20	20	20	16	10	10	8	8	8	8	0
Frau A.S.	72	72	72	72	72	72	66	66	66	66	60	50	40
	36	36	32	36	36	32	30	30	30	30	22	16	16
Frau U.S.	44	48	48	48	48	48	48	44	44	40	40	36	36
	24	24	24	28	28	28	28	24	24	20	20	18	18
Frau M.M.	62	66	66	66	66	54	40	40	40	40	40	36	36
	20	20	20	20	22	18	18	18	18	14	14	12	12
Frau A.P.	58	60	60	64	66	45	45	45	45	45	45	45	45
	40	46	50	54	54	30	30	30	30	30	30	30	30
Frau M.	56	56	56	56	60	48	38	36	32	32	32	32	32
Sch.	26	26	26	26	26	18	16	12	12	12	12	12	12
Frau E.R.	60	60	60	60	60	48	40	24	16	16	12	16	16
	40	40	40	40	40	24	18	8	8	8	8	12	12
Frau G.H.	52	62	62	62	62	42	32	32	32	32	32	32	32
	30	30	28	28	28	20	14	14	14	14	14	14	14
S + R.E.	55.863 ± 8.62	55.624 ± 8.21	55.298 ± 7.33	55.675 ± 8.06	55.884 ± 8.58	55.635 ± 8.32	55.702 ± 8.32	55.715 ± 8.58	55.736 ± 8.32	55.788 ± 8.68	55.785 ± 8.62	55.779 ± 8.79	55.744 ± 8.65
N.F.	55.863 ± 8.62	55.624 ± 8.21	55.298 ± 7.33	55.675 ± 8.06	55.884 ± 8.58	55.635 ± 8.32	55.702 ± 8.32	55.715 ± 8.58	55.736 ± 8.32	55.788 ± 8.68	55.785 ± 8.62	55.779 ± 8.79	55.744 ± 8.65
M.W.	12.22 32.44	60.89 94.78	61.33 92.00	61.11 93.11	62.44 94.22	51.00 74.33	45.67 65.67	41.00 59.00	38.38 55.67	36.156 52.56	35.10 49.22	33.44 47.22	31.89 44.56
	32.44	30.89	30.67	32.00	31.78	23.33	20.00	18.00	16.88	16.00	14.22	13.78	12.67

C	Tage vor- nach (+) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%]									
				µE/ml	—			0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	$\frac{E}{25 \text{ ml}}$
Pat.	- 4	271 — 202	1,7	32,27 63,07	— 1,20	0,64 — 1,20	72,5	3,59	2,80	2,43	2,04	1,64	1,19	0,96	0,49	0,45	1,91
		260 — 262	4,4	36,98 72,25	0,53 0,87	— — —	63	3,86	3,42	3,0	2,32	1,45	0,9	0,34	0,2	0,1	1,76
Frau A.S.	- 7	194 — 185	0,8	12,30 43,71	0,46 0,47	— — —	79	6,42	6,08	5,09	4,88	4,01	2,74	1,73	0,84	0,13	1,53
		300 — 345	30,5	47,13 85,15	0,45 0,56	— — —	75	4,20	3,85	3,31	3,00	1,98	1,54	1,10	0,76	0,34	1,78
Frau M.M.	- 3	249 — 102	2,2	24,23 96,02	0,53 0,65	— — —	79	7,62	6,64	6,59	6,51	4,09	3,27	1,52	1,18	0,66	0,66
		228 — 311	14,0	50,23 62,67	1,61 1,79	— — —	45,5	5,27	5,26	5,18	4,10	3,48	2,41	2,00	1,34	0,52	1,74
Frau M. Sch.	0	141 — 219	0,8	76,38 298,79	0,66 2,82	— — —	51,9	4,14	4,08	3,88	3,47	2,73	1,63	1,42	1,26	0,41	0,65
		249 — 254	19,6	147,13 202,45	0,37 1,04	— — —	66,7	7,87	7,40	6,87	5,45	4,33	3,44	1,75	1,52	0,77	0,91
Frau E.R.	- 8	194 — 157	0,5	31,84 61,04	0,75 1,12	— — —	71,2	7,06	6,54	6,10	5,78	4,70	3,01	2,23	1,98	0,68	1,61
		— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
St.B.W.	- 2,45 ± 0,82	5=48,34 — 16,11 ± 16,11 S=75,75 ± 25,125	5=10,94 — 3,58 ± 3,58 S=84,30 ± 8,30	5=40,02 — 13,34 ± 13,34 S=0,34 ± 0,34	5=0,37 — 0,13 ± 0,13 S=0,34 ± 0,34	5=41,76 — 3,92 ± 3,92	5=41,76 — 3,92 ± 3,92	5=1,71 — 0,57 ± 0,57	5=1,64 — 0,55 ± 0,55	5=1,63 — 0,54 ± 0,54	5=1,58 — 0,53 ± 0,53	5=1,24 — 0,44 ± 0,44	5=0,94 — 0,39 ± 0,39	5=0,58 — 0,19 ± 0,19	5=0,55 — 0,18 ± 0,18	5=0,24 — 0,08 ± 0,08	5=0,54 — 0,12 ± 0,12
		221,28 — 226,33	8,28 — 8,28	51,72 — 109,46	0,67 — 1,17	67,09 — 1,17	67,09 — 1,17	5,56 — 5,56	5,12 — 5,12	4,72 — 4,72	4,17 — 4,17	3,16 — 3,16	2,24 — 2,24	1,45 — 1,45	1,06 — 1,06	0,45 — 0,45	1,39 — 1,39

C	Pat.	Tage vor- nach (4) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin µE/ml — nüchtern — — postprandial —	C-Peptid ng/ml	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%]									
								µE/ml kaltes Insulin									
								0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	$\frac{E}{2,5 ml}$
	Frau O.B.	+ 3	$\frac{174}{137}$ —	Ø	$\frac{19,62}{20,78}$ — $\frac{0,82}{0,94}$		71,4	6,59	6,36	5,97	5,35	4,34	3,51	2,60	1,72	0,81	1,39
	Frau E.F.	+ 3	$\frac{212}{118}$ —	Ø	$\frac{24,97}{82,13}$ — $\frac{0,84}{1,26}$		63,8	4,30	4,21	4,00	3,5	2,60	1,80	1,00	0,80	0,60	2,0
	Frau A.S.	+ 3	$\frac{205}{142}$ —	Sp.	$\frac{14,24}{49,31}$ — $\frac{0,63}{0,75}$		75,3	8,33	7,68	6,57	6,11	4,57	3,62	2,38	1,45	0,53	1,35
	Frau U.S.	+ 2	$\frac{246}{234}$ —	0,6	$\frac{30,18}{91,16}$ — $\frac{0,45}{0,56}$		75,0	5,01	4,55	4,16	3,76	2,41	2,03	1,37	1,10	0,44	1,37
	Frau M.M.	+ 1	$\frac{269}{285}$ —	4,5	$\frac{42,54}{104,84}$ — $\frac{1,02}{1,13}$		79,0	10,73	9,76	9,50	8,75	6,33	4,91	2,17	1,55	0,90	0,76
	Frau A.P.	+ 3	$\frac{362}{374}$ —	26,4	$\frac{39,33}{61,08}$ — $\frac{3,09}{3,32}$		46,4	5,32	5,17	4,88	4,43	3,69	2,90	2,16	1,44	0,52	1,26
	Frau M. Sch.	+ 1	$\frac{241}{219}$ —	0,6	$\frac{130,59}{180,12}$ — $\frac{1,00}{1,58}$		51,9	5,17	4,08	3,83	3,53	3,11	2,98	1,72	1,09	0,89	0,87
	Frau E.R.	+ 1	$\frac{213}{181}$ —	2,1	$\frac{51,78}{82,25}$ — $\frac{0,21}{0,58}$		67,3	12,77	11,36	10,50	9,98	7,29	5,48	2,95	2,60	0,95	0,70
	Frau G.H.	+ 1	$\frac{185}{221}$ —	4,5	$\frac{47,16}{64,58}$ — $\frac{1,32}{1,72}$		70,2	10,86	10,74	9,99	8,41	5,97	4,82	1,81	1,25	0,67	0,74
			— —	—	— —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	St.R.	$\pm 1,00$ $\pm 0,33$	$\frac{562,4}{181,75}$ — $\frac{5}{87,02}$ — $\frac{24,01}{27,01}$	$\frac{8,49}{2,83}$ — $\pm 2,83$	$\frac{34,68}{141,56}$ — $\frac{1}{144,43}$ — $\frac{1}{144,81}$ — $\frac{1}{144,81}$	$\frac{0,83}{0,30}$ — $\pm 0,30$ — $\frac{1}{144,43}$ — $\frac{1}{144,81}$	$\frac{11,00}{3,67}$ — $\pm 3,67$	$\frac{3,11}{1,10}$ — $\pm 1,10$	$\frac{2,50}{1,102}$ — $\pm 1,102$	$\frac{2,71}{0,96}$ — $\pm 0,96$	$\frac{2,49}{0,88}$ — $\pm 0,88$	$\frac{1,33}{0,61}$ — $\pm 0,61$	$\frac{1,29}{0,46}$ — $\pm 0,46$	$\frac{0,61}{0,22}$ — $\pm 0,22$	$\frac{0,51}{0,18}$ — $\pm 0,18$	$\frac{0,43}{0,02}$ — $\pm 0,02$	$\frac{0,43}{0,45}$ — $\pm 0,45$
	M.F.		$\frac{234,89}{212,33}$	4,30	$\frac{44,49}{81,81}$	$\frac{1,04}{1,32}$	66,70	7,68	7,10	6,60	5,98	4,48	3,56	2,02	1,44	0,70	1,16

C	Tage vor- nach (+) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kp	Spezifische Bindung [%] µE/ml kaltes Insulin																	
				µE/ml	n			0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	E 2,5 ml								
Pat.																									
Frau O.H.	+ 7	180 147	Ø	Ø	12,29 17,67	0,91 1,30	71,0	8,39	7,87	7,80	7,01	5,89	4,12	2,76	1,52	0,79	2,69								
Frau E.F.	+ 6	221 168	Ø	Ø	27,81 68,72	0,41 0,73	62,9	4,36	4,20	3,95	3,5	2,6	2,0	1,3	0,8	0,4	1,0								
Frau A.S.	+ 6	105 68	Ø	Ø	12,65 51,33	0,64 0,86	75,3	9,8	8,0	6,85	5,77	4,0	2,94	1,89	1,23	0,18	1,51								
Frau U.S.	+ 6	201 273	4,9	4,9	21,46 72,11	0,65 0,78	73,4	5,83	5,27	5,03	4,11	2,81	2,19	1,63	1,24	0,63	1,99								
Frau M.M.	+ 4	290 320	Sp.	Sp.	42,3 97,06	1,13 1,33	79	10,24	10,08	9,41	9,36	6,11	5,01	2,18	1,75	1,12	0,92								
Frau A.P.	+ 5	281 386	44,0	44,0	24,77 47,55	3,24 3,43	46,4	5,61	5,54	5,11	4,62	3,74	2,86	1,97	1,33	0,67	0,81								
Frau M. Sch.	+ 3	207 255	1,6	1,6	102,26 124,15	1,24 1,96	51,9	5,78	5,47	5,26	4,70	3,42	2,27	1,53	1,13	0,43	0,88								
Frau E.R.	+ 5	286 269	38,7	38,7	32,38 57,62	0,85 1,07	66,7	14,46	13,25	12,02	11,74	8,10	6,34	2,61	1,67	0,39	1,82								
Frau G.H.	+ 6	166 191	Ø	Ø	62,09 97,98	0,63 2,30	70,6	13,04	11,74	11,35	10,11	8,26	6,74	4,41	1,97	0,30	0,99								
STERN	S=1,22 ± 0,41	S=62,23 ± 20,16 S=96,78 ± 32,26	S=77,35 ± 5,98 S=32,04 ± 40,67	S=28,75 ± 21,58 S=32,04 ± 40,67	S=0,85 ± 0,50 S=0,85 ± 0,51	S=10,83 ± 3,63	S=3,55 ± 1,18	S=3,77 ± 1,06	S=2,73 ± 0,98	S=2,36 ± 0,99	S=2,48 ± 0,93	S=1,82 ± 0,64	S=0,94 ± 0,31	S=0,86 ± 0,12	S=0,29 ± 0,10	S=0,65 ± 0,22									
M.F.																									
M.W.	5,73	245,22 230,78	9,91	9,91	32,56 70,47	1,08 1,53	66,36	8,61	7,94	7,42	6,77	4,99	3,83	2,25	1,40	0,55	1,40								

C	Tage vor- nach (4) Therapie	Blut- zucker 9 Uhr 13 Uhr	Harn- zucker g	Insulin		C-Peptid ng/ml nüchtern postprandial	Gewicht kg	Spezifische Bindung [%] µE/ml kaltes Insulin											
				µE/ml	nüchtern postprandial			0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10 ⁴	E 2,5 ml		
Pat.																			
Frau O.H. B.	+ 14	232 — 197	0,5 — —	17,23 — 24,36	0,76 — 1,46	70,1 — —	8,79 — —	8,52 — —	7,74 — —	7,34 — —	6,18 — —	4,13 — —	3,01 — —	1,84 — —	0,86 — —	1,64 — —			
Frau E.F.	+ 14 + 17	199 — 156	212 — 169	30,15 — 66,54	0,68 — 1,27	62,2 — —	7,2 — 7,3	6-9 — 7-0	6-5 — 6-7	5,5 — 5,8	3,9 — 4,0	2,4 — 3,1	1,6 — 1,8	1,2 — 1,3	0,8 — 0,7	1,8 — 1,5			
Frau A.S.	+ 14	244 — 114	— — —	30,89 — 57,04	0,63 — 1,20	74,7 — —	9,92 — —	9,46 — —	7,72 — —	7,23 — —	5,55 — —	4,06 — —	2,69 — —	1,86 — —	0,76 — —	1,12 — —			
Frau U.S.	+ 13	221 — 188	— — —	47,22 — 83,22	0,86 — 0,96	75,4 — —	6,04 — —	5,69 — —	5,27 — —	4,53 — —	3,11 — —	2,59 — —	1,89 — —	1,44 — —	0,81 — —	1,44 — —			
Frau M.M.	+ 8	173 — 307	9,4 — —	45,71 — 102,21	0,90 — 0,90	79 — —	9,84 — —	9,31 — —	8,98 — —	8,42 — —	6,19 — —	4,47 — —	1,97 — —	1,75 — —	0,38 — —	0,73 — —			
Frau A.P.	+ 18 + 34	147 — 218	14,4 — —	28,93 — 46,12	2,13 — 2,56	47,2 — —	5,31 — 7,35	5,31 — 6,84	5,25 — 6,01	4,22 — 4,97	3,68 — 4,02	2,82 — 3,16	1,64 — 2,23	1,24 — 1,76	0,33 — 0,65	1,33 — 2,13			
Frau M. Sch.	+ 9	260 — 211	— — —	36,09 — 74,93	0,95 — 2,36	51,1 — —	6,29 — —	5,97 — —	5,40 — —	4,86 — —	3,38 — —	2,49 — —	1,95 — —	1,28 — —	0,68 — —	0,71 — —			
Frau E.R.	+ 7	262 — 305	14 — —	9,65 — 11,72	0,66 — 0,92	66,7 — —	21,20 — —	19,33 — —	18,90 — —	18,03 — —	11,88 — —	9,08 — —	4,04 — —	3,11 — —	1,36 — —	2,12 — —			
Frau G.H.	+ 10	208 — 189	— — —	70,22 — 92,91	2,36 — 2,61	70,6 — —	12,78 — —	10,53 — —	9,72 — —	9,52 — —	8,57 — —	7,85 — —	4,58 — —	2,49 — —	0,59 — —	0,82 — —			
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
StAW	S=2,59 ± 1,20	S=38,86 ± 12,95 S=67,97 ± 20,39	S=6,41 ± 2,14 S=5,34 ± 0,72	S=17,82 ± 5,34 S=30,48 ± 10,16	S=0,66 ± 0,23 S=0,97 ± 0,26	S=10,96 ± 3,65 S=40,46 ± 10,26	S=4,91 ± 1,64	S=4,30 ± 1,43	S=4,23 ± 1,42	S=4,23 ± 1,42	S=2,88 ± 0,96	S=2,43 ± 0,81	S=1,01 ± 0,36	S=0,64 ± 0,21	S=0,30 ± 0,10	S=0,50 ± 0,17			
M.F.	11,89	215,22 209,44	4,26	35,12 62,12	1,10 1,58	66,33	9,74	9,10	8,39	7,74	5,83	4,43	2,60	1,80	0,73	1,30			
M.W.																			

Gruppe C: Insulinfähige Patienten, umgestellt auf die Kombinationstherapie

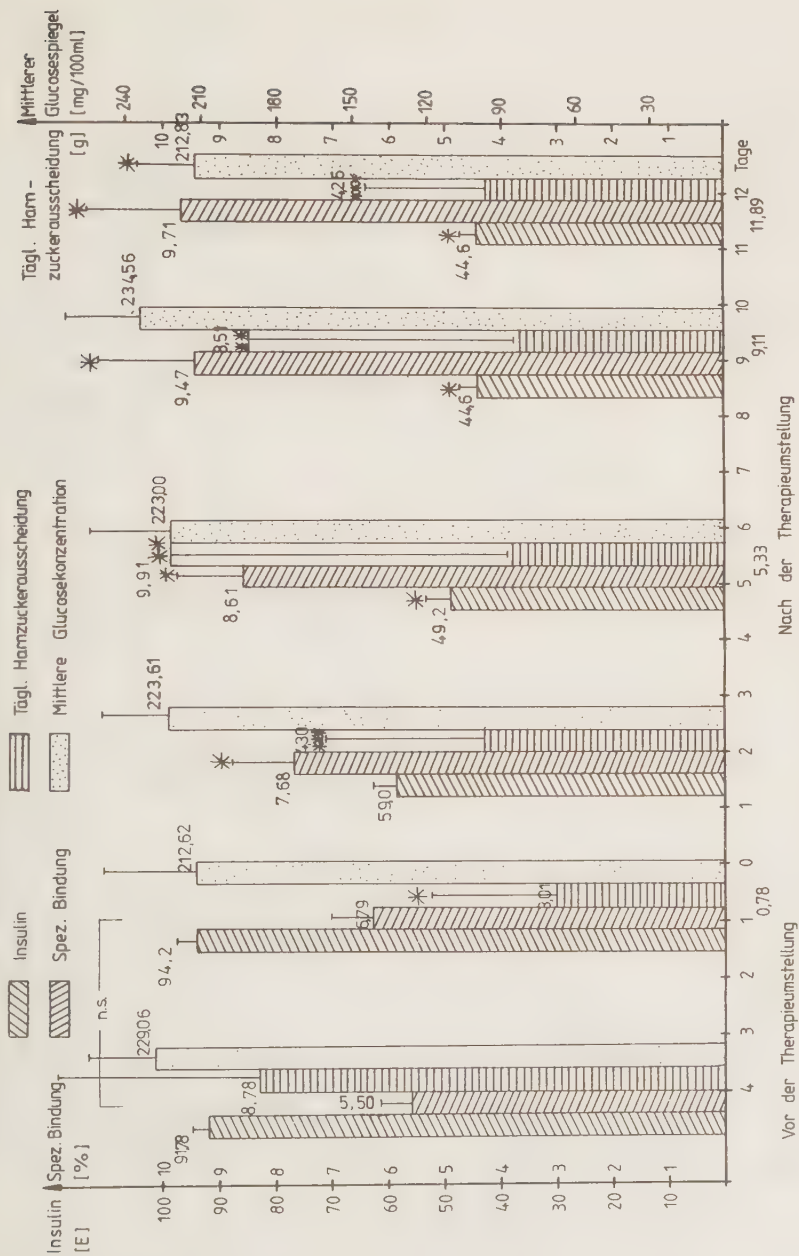


ABB. 22: Änderung der klinischen Parameter der Gruppe C

*Signifikant ($\alpha \leq 0.01$) gegenüber dem Ausgangswert vor Therapieumstellung

**n.s. gegenüber dem Ausgangswert am vierten Tag

***signifikant ($\alpha \leq 0.02$) gegenüber dem Ausgangswert

Gruppe C : Insulinpflichtige Patienten, umgestellt auf die Kombinationstherapie

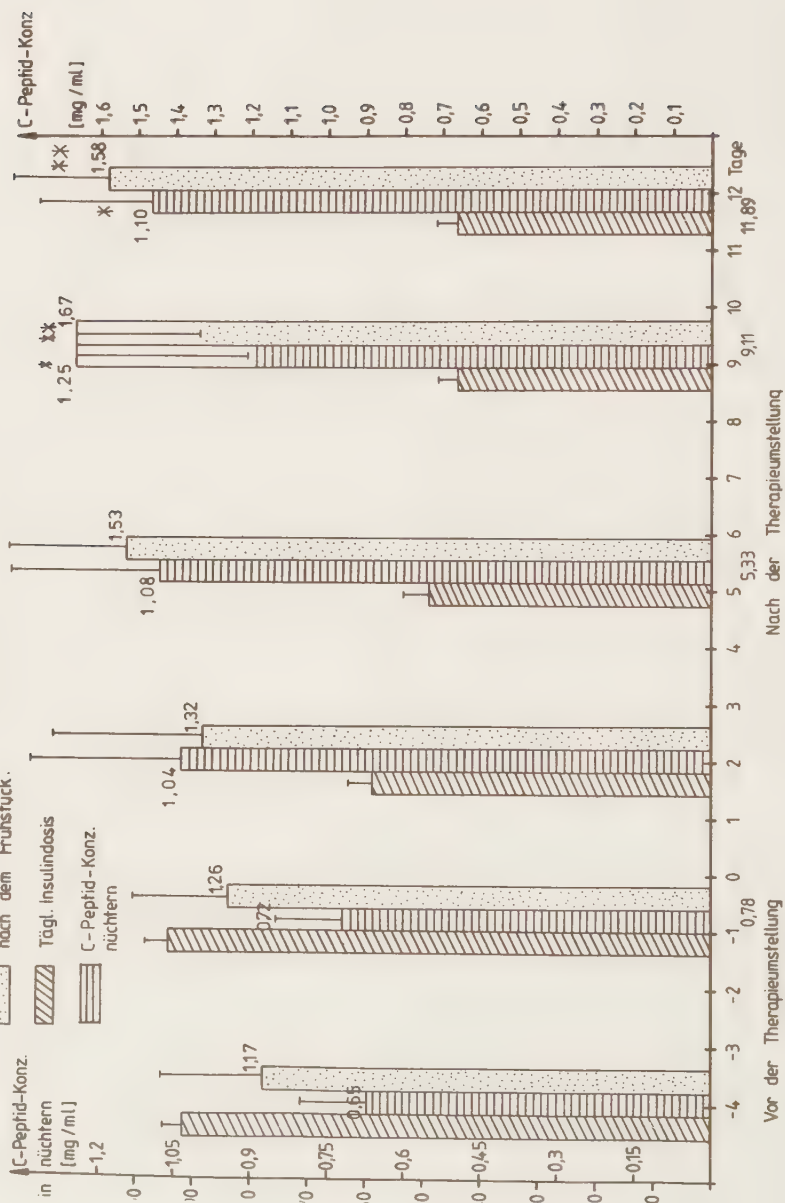


ABB. 23: Änderung der klinischen Parameter der Gruppe C im Verlauf der Therapieänderung

*Signifikant ($\alpha < 0,01$) gegenüber dem Ausgangswert

**Schwach signifikant ($\alpha < 0,1$) gegenüber dem Ausgangswert

GRUPPE C :

□ : 4,00 Tage vor der Therapieänderung

○ : 2,00 Tage nach der Therapieänderung

△ : 11,89 Tage nach der Therapieänderung

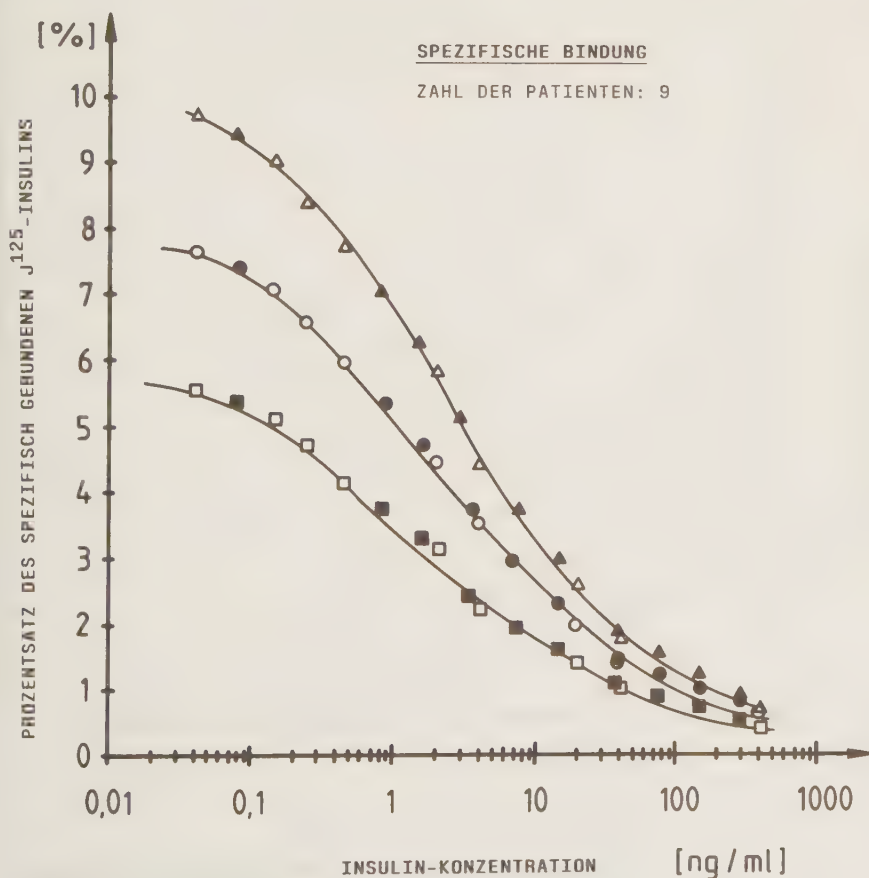


ABB.24: Gruppe C: Spezifische Bindung

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE C :

□ : 4,00 Tage vor der Therapieänderung $R_0 = 0,68$

○ : 2,00 Tage nach der Therapieänderung $R_0 = 0,83$

△ : 11,89 Tage nach der Therapieänderung $R_0 = 1,1$

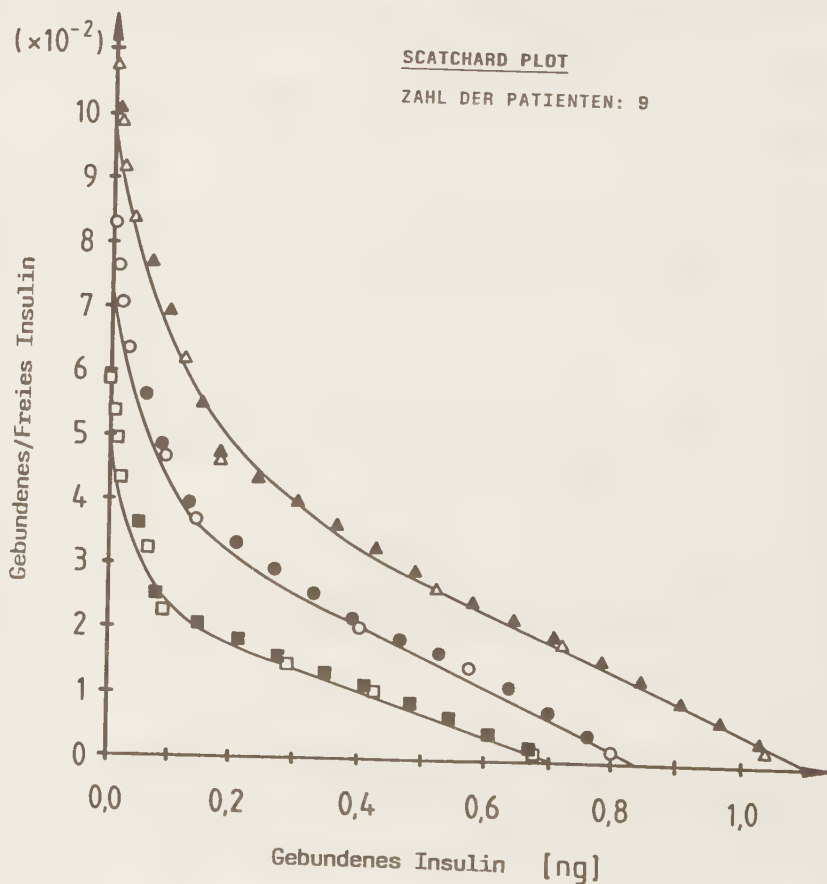


ABB.25: Gruppe C: Scatchard-Darstellung zur Bestimmung der Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

GRUPPE C :

□ : 4,00 Tage vor der Therapieänderung

○ : 2,00 Tage nach der Therapieänderung

△ : 11,89 Tage nach der Therapieänderung

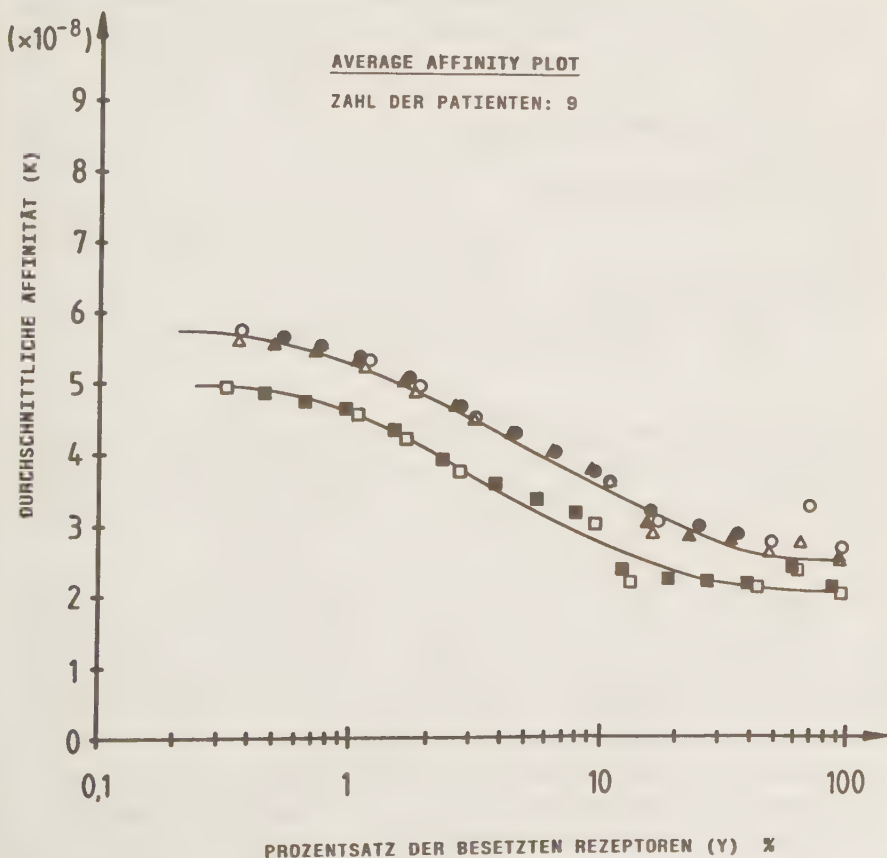


ABB.26: Gruppe C: Bestimmung der Rezeptoraffinität

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■ ● ▲) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

IV.4 DIE INSULINBINDUNG EINER NORMALGRUPPE ZUM QUANTITATIVEN VERGLEICH

In einer früheren Arbeit (71) war die Insulinbindung von Erythrozyten bei 10 gesunden Jugendlichen (4 Männer, 6 Frauen) gemessen worden. Da sich diese Vergleichsgruppe in wesentlichen Parametern von den Patienten der Gruppen A bis C unterscheidet (Alter, Gewicht, keine stationäre Aufnahme) und da zur Bindungsmessung Humaninsulin (es wurde freundlicherweise von der Fa. Eli Lilly, Bad Homburg zur Verfügung gestellt) statt Schweineinsulin verwendet wurde, können die gemessenen Bindungen nur qualitativ miteinander verglichen werden.

BINDUNGSWERTE DER NORMALGRUPPE:

Insulin-Konzentration ($\mu\text{E/ml}$)

0	2,5	5	10	50	100	500	1000	10000
---	-----	---	----	----	-----	-----	------	-------

Spezifische Bindung (%)

10,2	9,54	9,38	9,3	6,3	5,7	2,3	1,4	0,68
------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	------

Die **spezifische Bindung** bei einer Normalgruppe ist demnach vergleichbar mit derjenigen, die unter der Kombinationstherapie mit möglichst niedrigen Insulindosen bei Diabetikern erzielbar ist (10,2% vs. 9,25 % bei Gruppe B bzw. 9,71 % bei Gruppe C).

Die graphischen Darstellungen dieser Bindungswerte finden sich in den Abb. 27-29.

Aus ihnen bzw. aus dem Scatchard plot (Abb. 28) läßt sich die **Dichte der Insulinrezeptoren** berechnen: Das gesunde Kollektiv wies im Mittel 35 Rezeptoren/Erythrozyt auf.

Die **Affinität** der Rezeptoren im unbesetzten Zustand, der im Unterschied zu den Diabetiker-Kollektiven schon erreicht wurde, wenn weniger als 3 % der Rezeptoren besetzt waren, betrug $5,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Waren mehr als 40 % der Rezeptoren besetzt, hatten diese nur mehr die Affinität $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zu Insulin (Abb. 29).

VERGLEICHSGRUPPE :

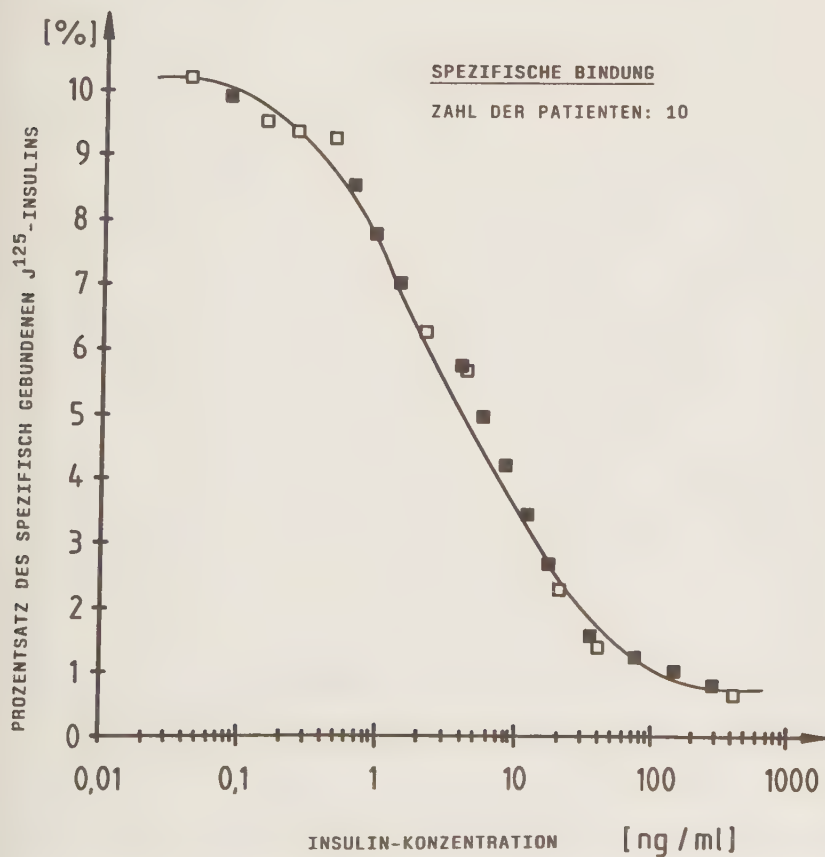


ABB.27: Normalkollektiv: Spezifische Bindung

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

VERGLEICHSGRUPPE: $R_0 = 1,17$

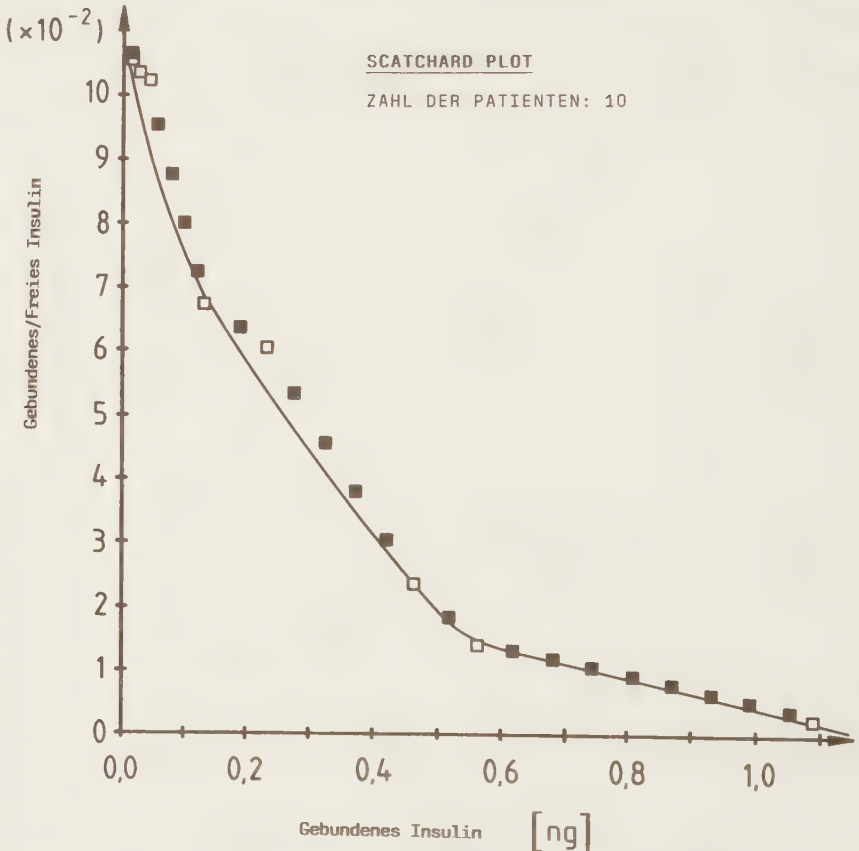


ABB.28: Normalkollektiv: Scatchard-Darstellung zur Bestimmung der Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

VERGLEICHSGRUPPE :

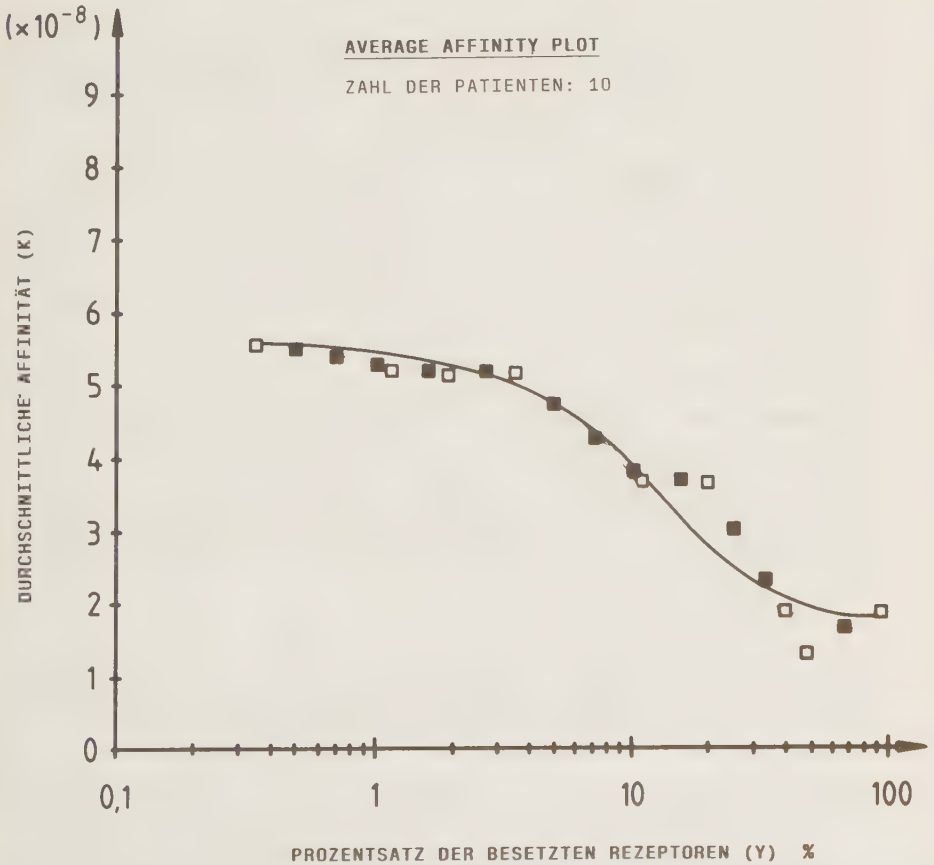


ABB.29: Normalkollektiv: Bestimmung der Rezeptoraffinität

Die schwarz ausgefüllten Zeichen (■) markieren die durch numerische Recheninterpolation erhaltenen Zwischenwerte

V. Vergleich der Gruppenergebnisse miteinander und Diskussion

Die schon häufig mitgeteilte Beobachtung (22 - 32), daß bei einer Kombinationstherapie mit Sulfonylharnstoffen weniger Insulin benötigt wird als bei der Insulin-Monotherapie um die Serum-Glucose-Konzentration von Typ II-Diabetiker auf physiologische Werte einzustellen, wurde in dieser kontrollierten Studie bestätigt.

Bei den **Gruppen A und B**, die zu Beginn der Therapie vergleichbare **Blut- und Harnzuckerspiegel** aufwiesen, verbesserten sich diese Stoffwechselparameter unter der Mono- bzw. Kombinationstherapie signifikant auf statistisch gleiche Werte.

Die **Gruppe A** benötigte für diese Verbesserung allerdings im Mittel **33,2 E Insulin/Tag**, verteilt auf zwei Spritzen (bei 6 von 10 Pat.) wohingegen der **Gruppe B** neben 3 Euglucon 5-Tabletten die einmalige Gabe von durchschnittlich **12,2 E Insulin** ausreichte. Diese Insulineinsparung ist mit $p < 0,001$ signifikant.

Bei der täglichen hohen Insulinzufuhr nahm bei der **Gruppe A** die **Insulinsekretion**, gemessen an der **C-Peptid-Konzentration**, signifikant ab ($p < 0,001$), während sie bei der signifikant gering Insulindosis, die bei der **Gruppe B** genügte, statistisch gleich und im Normbereich blieb. Mit anderen Worten wird also die endogene Insulinproduktion durch die Zufuhr hoher Insulindosen bzw. durch den Verzicht auf Glibenclamid verringert.

Eine **Korrelation** zwischen der Höhe der täglichen **Insulindosis** und der Abnahme der **C-Peptid-Konzentration** konnte allerdings nicht mit der erforderlichen statistischen Sicherheit nachgewiesen werden.

Die vielen exogen zugeführten Insulineinheiten erhöhten die **Plasma-Insulin-Konzentration** der **Gruppe A** beträchtlich, jedoch, der hohen Standardabweichungen wegen, nicht signifikant. Bei der **Gruppe B** hingegen stieg die Insulin-Konzentration im Vergleich zur Glibenclamid-Therapie nur ganz wenig auf signifikant niedrigere Werte als bei der **Gruppe A** an. Das bedeutet aber, daß die erzielte Stoffwech-

selverbesserung bei der **Gruppe B** im Gegensatz zur **Gruppe A** nicht mit erhöhten Plasmainsulinspiegel erklärt werden kann.

Eine Erklärung für die verbesserte Stoffwechselsituation ergibt sich aus der Erhöhung der spezifischen Bindung von Insulin an die Rezeptoren der Erythrozyten. Denn durch eine erhöhte Affinität dieser Rezeptoren bzw. durch ihre Vermehrung wird mit weniger Insulin eine größere Wirkung erzielt.

In der Tat ging bei der **Gruppe A** unter der Monotherapie die **Höhe der spezifischen Bindung** signifikant zurück (Abb. 14). Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Zahl der zugeführten Insulineinheiten und der Abnahme der spezifischen Bindung nachgewiesen werden. Bei der zusätzlich mit Glibenclamid behandelten Gruppe B stieg diese unter der Kombinations-therapie signifikant an (Abb. 19).

Wird die Veränderung der spezifischen Bindung durch eine Änderung der Rezeptorzahl oder der Rezeptoraffinität verursacht?

Die **Zahl der Rezeptoren pro Erythrozyt** nahm bei der **Gruppe A** unter der Therapie um 27 % von 33 auf 24 Rezeptoren ab.

Für die **Gruppe B** (Abb. 20) ergibt sich hingegen im Rahmen der Meßgenauigkeit eine ganz geringe Zunahme der Rezeptoren von 33 auf 34.

Die Anzahl der Rezeptoren vor Beginn der Therapieumstellung war bei beiden Gruppen gleich, ein weiterer Beweis dafür, daß es sich um zwei Gruppen derselben Grundgesamtheit handelt.

Einen möglichen Einfluß der unterschiedlichen Therapien auf die **Affinität der Rezeptoren** zu Insulin müßte sich auf die 'average affinity plots' (Abb. 16 und 21) auswirken: Sowohl bei der **Gruppe A** wie auch bei der **Gruppe B** ergibt sich im Verlauf der beiden Therapien keinerlei Änderung im Kurvenverlauf, d.h. sowohl die langfristige Gabe von Insulin wie auch von Insulin plus Gliben-

clamid hat keinen Einfluß auf die Rezeptoraffinität. Die '**empty sites affinity**', also die Affinität der Rezeptoren zu Insulin, wenn nur wenige der Rezeptoren besetzt sind (hier: 0,4 %), beträgt bei der **Gruppe A** $5,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Abb. 16), bei der **Gruppe B** $4,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Abb. 24). Die Insulinrezeptoren beider Gruppen unterscheiden sich im unbesetzten Zustand also nicht, da die Meßwerte nur um 6 % auseinanderliegen, was innerhalb der statistischen Streuung von 10 % liegt.

Die '**filled sites affinity**' d.h. die minimale Rezeptoraffinität zu Insulin, die bei beiden Gruppen auftritt, wenn mehr als 30 % der Rezeptoren besetzt sind, beträgt bei beiden Gruppen ca. $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Die Rezeptoren beider Gruppen unterscheiden sich also auch nicht im Sättigungszustand.

Zur weiteren Sicherung des Ergebnisses, daß die Insulin plus Glibenclamid-Kombinationstherapie einen positiven Einfluß auf die Insulinrezeptoren ausübt, wurde eine **Gruppe C** untersucht, die trotz einer täglichen Insulindosis von durchschnittlich 92,2 E pathologisch hohe Blut- und Harnzuckerwerte aufwies. Bei dieser **Gruppe C** ging unter der Kombinationstherapie die tägliche **Harnzuckerausscheidung** und die **Serum-Glucose-Konzentration** (am 11,9. Tag nach der Umstellung) signifikant auf Werte zurück, die denen der **Gruppe B** statistisch glichen (Abb. 22 und 23). Am eindrucksvollsten aber war der Rückgang der benötigten Insulinmenge: um mehr als die Hälfte, von 92,2 E auf 44,6 E reduzierte sich der **tägliche Insulinbedarf**. Die **Plasma-C-Peptid-Konzentration** nahm unter der Kombinationstherapie signifikant zu, obwohl sie auch vor der Therapieumstellung noch im Normalbereich lag. Es konnte jedoch keine (negative) **Korrelation** zwischen den **C-Peptid-Spiegeln** und der verabreichten **Insulindosis** festgestellt werden. Dies wäre ein Zeichen dafür, daß die Sekretionsleistung der β -Zellen im Sinne eines linearen Regelkreises durch die Höhe der Insulingabe beeinflusst wird. Durch die große Menge zugeführten Insulins waren die **freien Plasmainsulinspiegel** vor Beginn der Kombinationstherapie pathologisch hoch. Sie reduzieren sich, allerdings nicht signifikant, unter der Kombinationstherapie auf physiologische Werte. Dies ist ein Beweis dafür, daß

die erzielte Stoffwechselverbesserung bei der **Gruppe C** nicht von der Höhe des Plasmainsulinspiegels abhängt, da dieser unter der Therapie sogar abnahm, sondern daß eine Verbesserung der Insulinwirkung, also eine Änderung auf Rezeptorebene erfolgt sein muß. Diese Änderung der Rezeptoren unter der Therapie läßt sich nachweisen: Vor der Therapieumstellung war bei der **Gruppe C** die **spezifische Bindung** des Insulins an die Erythrozyten signifikant geringer als bei der **Gruppe B**. Unter der Kombinationstherapie nahm die spezifische Bindung dann kontinuierlich um 75 % (Abb. 24) zu, so daß sie sich statistisch nicht mehr von der spezifischen Bindung der Gruppe B unterschied.

Es bestand dabei eine **Korrelation** zwischen der Zunahme der **spezifischen Bindung** und der Abnahme der **täglichen Insulinzufuhr**. Das heißt aber, daß die Höhe der spezifischen Bindung der Insulinrezeptoren direkt durch die exogene Zufuhr von Insulin beeinflusst wird.

Der Grund der Änderung der spezifischen Bindung läßt sich wieder aus dem Scatchard bzw. 'average affinity plot' (Abb. 25 und 26) entnehmen.

Aus der Abb. 25 erkennt man die unterschiedliche Form und die verschiedenen Schnittpunkte der jeweiligen Kurven mit der Abzisse. Hieraus läßt sich wiederum die **Zahl der Rezeptoren** pro Erythrozyt nach Formel (6), Kapitel III.2.5 berechnen: Bei der **Gruppe C** nahm unter der Kombinationstherapie die **Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt** von 21 um fast 60 % auf 33 zu. Die unter den exzessiven Insulindosen bzw. bei den pathologisch erhöhten Plasmainsulinspiegeln stark verringerte Zahl der Insulinrezeptoren nimmt demnach unter der Kombinationstherapie um mehr als die Hälfte bis auf normale Werte (Zahl der Rezeptoren der "Normalgruppe": 35) zu.

Die '**empty sites affinity**' der Rezeptoren unterschied sich, wie sich aus Abb. 25 ablesen läßt, mit $5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ vor Beginn der Therapieumstellung nicht von der der **Gruppen A und B**.

Die '**filled sites affinity**' die sich bei dieser **Gruppe C** schon einstellt, wenn nur 15 % der Rezeptoren besetzt waren, betrug ca.

$2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Ob dies schon eine signifikante Differenz zu den entsprechenden Werten der Gruppe A und B ($1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) darstellt, die auf eine Einschränkung der Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung bei dieser **Gruppe C** hindeutet, läßt sich bei der großen Fehlerbreite dieser Meßwerte nicht sagen.

Da aber die **'filled sites affinity'** unter der Therapie noch weiter auf $2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zunahm (Abb. 25), liegt die Vermutung nahe, daß die unter der Therapie neugebildeten Rezeptoren bei zunehmender Besetzung eine geringere Abnahme der Affinität der Nachbarrezeptoren, also eine geringere negative Kooperativität aufweisen.

Ebenso könnte die Zunahme der **'empty sites affinity'** auf $5,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ signifikant sein und damit einen Hinweis geben, daß die zusätzlich in Erscheinung tretende Rezeptorpopulation eine insgesamt etwas höhere Affinität als die alte besitzt. Dies kann auch aus der Parallelität der **'average affinity'**-Kurven geschlossen werden. Unter der Kombinationstherapie nimmt ja die ursprüngliche Affinität linear, also unabhängig von der Rezeptorbesetzung um $0,6$ bis $0,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zu.

Da die Zahl der Rezeptoren in der **Gruppe C** um etwas mehr als 50 % zunimmt, müßten demnach die neugebildeten Rezeptoren eine Affinität von ca. $6,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ im unbesetzten und von ca. $3,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ im besetzten Zustand haben. Es soll aber noch einmal betont werden, daß aus den vorliegenden Meßwerten bezüglich der Affinität der neugebildeten Rezeptoren noch keine gesicherten Ergebnisse abgeleitet werden können. Da die Affinitätsunterschiede relativ klein, die Streuung der Meßwerte aber ziemlich groß sind, müßte eine solche Affinitätsmessung an einem mehrfach größeren Patientenkollektiv wiederholt werden.

Die maximale **spezifische Bindung** war bei der gesunden Kontrollgruppe mit 10,2 % (Abb. 27) etwas höher als die jeweils maximale Bindung der **Gruppe A** mit $8,79 \pm 0,71 \%$, der **Gruppe B** mit $9,25 \pm 0,90 \%$ und der **Gruppe C** mit $9,71 \pm 1,64 \%$. Bei der Größe des mittleren Fehlers liegen jedoch die Werte der maximalen Bindung

aller untersuchten Gruppen in derselben Größenordnung.

Dasselbe gilt für die aus den entsprechenden **Scatchard-Kurven** berechneten **Rezeptorzahlen**:

Das gesunde Kollektiv wies im Mittel 35 Rezeptoren/Erythrozyt auf (Gruppe A zu Therapiebeginn 33, Gruppen B und C bei Therapie-schluß 34 bzw. 33). Die **Affinität** der Rezeptoren im unbesetzten Zustand, der im Unterschied zu den Diabetikern-Kollektiven schon erreicht wurde, wenn weniger als 3 % der Rezeptoren besetzt waren, betrug $5,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Waren mehr als 40 % der Rezeptoren besetzt, hatten diese nur mehr die Affinität $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ zu Insulin (Abb. 25). Die Affinität der Rezeptoren der Gesunden war somit vergleichbar mit den Rezeptoraffinitäten der Diabetikergruppen A und B.

Die mögliche Ursache der bei der Gruppe C gemessenen erhöhten Rezeptoraffinität wurde bereits diskutiert.

V.1 Folgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit für eine mögliche Therapieempfehlung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Typ II-Diabetiker, die allein mit hohen Dosen Insulin behandelt werden, signifikant schlechter auf das zugeführte Insulin ansprechen als Patienten, die eine Kombinationstherapie aus Insulin plus Glibenclamid erhalten.

Zumindest eine Ursache der verringerten Insulinwirkung liegt in der signifikant geringeren spezifischen Bindung von Insulin an die Insulinrezeptoren der Erythrozyten. Grund für diese Bindungsabnahme ist die verringerte Zahl der Rezeptoren, nicht eine Abnahme in der Affinität der Rezeptoren. Die Affinität entspricht vielmehr derjenigen von gesunden Probanden.

Da eine Korrelation zwischen der spezifischen Bindung und der Zahl der täglich zugeführten Insulineinheiten gefunden wurde, hat die Höhe der täglichen Insulingabe bzw. die Höhe der Insulin-Konzentration im Plasma einen ganz wesentlichen Einfluß auf die Zahl der Rezeptoren (sogenannte 'down-regulation'). Inwieweit Glibenclamid die Rezeptorenanzahl beeinflusst, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden. Hierzu müßte man die Rezeptoren von Typ II-Diabetikern, die einmal mit Sulfonylharnstoffen, einmal ohne jede medikamentöse Therapie behandelt werden, untersuchen.

Als **Therapieempfehlung** läßt sich aus der vorliegenden Untersuchung ableiten, daß unter allen Umständen so wenig Insulin als möglich zugeführt werden soll, da sonst die Zahl der Insulinrezeptoren und damit die Wirksamkeit von Insulin abnimmt.

Die schon früher immer wieder erhobene Forderung (z.B. (61)), die Therapie des Typ II-Diabetes müsse primär eine Gewichtsreduktion und die strenge Einhaltung einer Diät, nicht Gabe von Insulin sein, wird durch die neuen Ergebnisse über das Verhalten der Rezeptoren bestätigt.

Wird aber trotz strenger Diät die zusätzliche Gabe von Insulin unumgänglich, dann sollte nach den Ergebnissen dieser Studie und nach Empfehlung anderer Autoren (31, 183-186) zunächst mit kleinstmöglichen Insulindosen in Verbindung mit einem oralen Antidiabetikum vom Typ der Sulfonylharnstoffe eine Verbesserung der Stoffwechsellage versucht werden.

VI. FEHLERABSCHÄTZUNG

Wie bei allen Meßprozessen können auch vorliegende Messungen mit

- a) systematischen und
- b) zufälligen

Fehlern behaftet sein.

Systematische Fehler, die ja auch bei der Mittelung vieler Einzelmessungen nicht eliminiert werden, können besonders bei der Präparation der Erythrozyten und bei der Durchführung der Bindungstests auftreten.

Nach Beck-Nielsen (144) ist die spezifische Bindung von Monozyten ca. 200-fach höher als die von Erythrozyten. Bei letzteren hängt die Höhe der spezifischen Bindung stark von ihrem Alter ab (132, 152). Um **systematische Fehler** also möglichst gering zu halten, ist demnach eine sorgfältige Trennung der Erythrozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen des Vollbluts notwendig. Außerdem ist bei jeder Messung die Retikulozytenzahl als ein Maß für die Neuproduktion der roten Blutkörperchen zu bestimmen, weil mit der Zahl der Retikulozyten die spezifische Insulinbindung stark ansteigt (133). Zusammen mit der Bestimmung der Erythrozyten-Konzentration der Blutprobe können damit auch größere Abweichungen vom durchschnittlichen Zellalter ausgeschlossen werden, was ja ebenfalls einen Einfluß auf die Höhe der Bindung hat (105).

Außerdem muß der verwendete Puffer, wie schon mehrfach betont wurde, möglichst häufig unter sterilen Bedingungen hergestellt werden, da sich sonst eine deutlich erhöhte unspezifische Bindung ergibt. Genauso mißt man hohe unspezifische Bindungen, wenn altes bzw. mehrfach aufgetautes Insulin eingesetzt wird.

Außerdem nimmt die Menge des intakten, radioaktiv markierten Insulins stetig ab, da sich das ^{125}J -Isotop mit der Zeit aus dem Molekülverband löst (178). So nimmt innerhalb von 60 Tagen der Gehalt

des biologisch aktiven, heißen Insulins durch Degradation um 28 % ab, ein Umstand, der bisher nicht berücksichtigt worden ist und der zusätzlich zu der natürlichen Abnahme der Radioaktivität (Halbwertszeit ^{125}J -Insulin = 60 Tage (179)) berücksichtigt werden muß.

Unspezifische Bindungen über 2,0 % der insgesamt eingesetzten Radioaktivität sind immer ein Zeichen dafür, daß die Bindungsuntersuchung nicht korrekt durchgeführt wurde.

Weitere **systematische** Fehler treten auf, wenn die Inkubationszeit zu kurz (Sättigung der Rezeptoren mit Insulin ist noch nicht vollständig) oder zu lang (Veränderung des Insulins oder wieder Trennung vom Rezeptor) gewählt wird. (Siehe Abschnitt III.2.4).

Die **systematischen Fehler**, die bei unsorgfältiger Trennung des gebundenen vom nicht gebundenen ^{125}J -Insulin auftreten, lassen sich bei genauer Durchführung der Trennungsprozedur und durch Verwendung einer Absaugvorrichtung vermeiden.

Zufällige Fehler, die bei der Präparation der Erythrozyten sowie bei deren Inkubation auftreten, sind im wesentlichen Pipettier- und Ablesefehler. Diese Fehler lassen sich verringern, indem man immer jeweils zwei Blutproben abnimmt, mit denen man dann getrennt die Bindungsstudien durchführt. Da die Ergebnisse solcher Doppelbestimmungen nur um maximal 5 % voneinander abweichen, und in jedem Fall die systematischen Fehler überwogen, wurde auf eine Doppelbestimmung verzichtet bzw. diese nur im letzten Schritt, der Trennung des gebundenen vom ungebundenen Insulin beibehalten.

Bei der Auswertung der gemessenen Bindungswerte können insbesondere bei der Bestimmung der Rezeptorzahl mit Hilfe der Scatchard-Darstellung enorme Fehler auftreten. Dies erklärt auch, weshalb die bisher angegebenen Bindungswerte nur um 118 % differieren (niedrigster zu höchstem Wert, siehe Tab. 3), die Angaben über die Zahl der Rezeptoren hingegen um 7600 % auseinanderliegen. Da in die 'average affinity'-Darstellung die Ergebnisse des Scatchard-plots eingehen, liegt die Fehlerbreite ebenfalls in derselben Größen-

ordnung, nämlich bei 6000 % (Tab. 3). Werden die höchsten bzw. niedrigsten Werte, die in der Literatur angegeben werden außer Acht gelassen, dann stimmen alle Bindungswerte bis auf 25 % überein, ein guter Beweis für die Reproduzierbarkeit und damit für die Vergleichbarkeit verschiedener Bindungsmessungen.

Bei der **Scatchard-Darstellung** differieren unter denselben Bedingungen die Angaben immer noch um fast 1000 %, ein Hinweis dafür, daß nicht die Erhebung der Meßwerte, sondern ihre Auswertung die hohen Fehler verursacht.

Die Gründe dafür sind, daß

- 1) die Mehrzahl der Bindungswerte üblicherweise bei physiologischen Konzentrationen des unmarkierten Insulins, also im Bereich 0-100 $\mu\text{E/ml}$ gemessen werden, nicht bei hohen Konzentrationen im Bereich 1000-10000 $\mu\text{E/ml}$. Diese Meßwerte bestimmen jedoch den Schnittpunkt der Scatchard-Kurve mit der Abzisse, woraus aus Gl. 6 die Zahl der Rezeptoren berechnet wird. Bei wenig Meßpunkten in diesem Bereich ist der Schnittpunkt entsprechend schlecht definiert.
- 2) bei hohen Insulin-Konzentrationen sich mehrere Insulinmoleküle aneinander anlagern können, so daß ein Rezeptor somit mehrere Moleküle bindet. Dies führt dann zu einer relativ erhöhten Gesamtbindung bzw. zu viel zu hohen Rezeptorzahlen.

Durch Messungen im Bereich hoher Insulin-Konzentrationen kann diejenige Konzentration festgestellt werden, bei der diese Aneinanderlagerung auftritt. Meßwerte, die bei höheren Insulin-Konzentrationen erhoben werden - wobei diese "Grenz-Konzentration" keine Konstante ist, sondern wiederum vom Alter und von der Reinheit des Puffers und des verwendeten Insulins abhängt - müssen verworfen, bzw. um eine entsprechend höhere unspezifische Bindung korrigiert werden. Letzteres wurde bei den vorliegenden Meßreihen berücksichtigt.

3) ungeeignete Verfahren zur Interpolation der Meßwerte verwendet werde. Die graphische Interpolation "nach Gefühl" mittels eines Lineals führt, insbesondere wenn die unter 2) beschriebenen Fehler nicht berücksichtigt werden, zu völlig falschen Rezeptorzahlen. Die ursprünglich sehr hohen Angaben über die Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt (z.B. 2000 (68)) sind mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen. In späteren Veröffentlichungen derselben Autoren (69, 70) wurden jedenfalls ohne weiteren Kommentar die Zahlenangaben um den Faktor 10 nach unten korrigiert.

Numerische Methoden zur Ausgleichsrechnung, also zur Bestimmung des Abzissen-Schnittpunktes der Scatchard-Kurve sind zuverlässiger. Die üblicherweise verwendete "Methode der kleinsten Quadrate", die schon auf Carl-Friedrich Gauss zurückgeht, eignet sich jedoch nicht, da u.a. die Meßwerte in der Scatchard-Darstellung nicht normalverteilt sind (172).

Mit der Tschebyschew-Approximierung, die allerdings empfindlich gegen Ausreißer ist, lassen sich hingegen, wie in (172) ausführlich dargestellt ist, die erhaltenen Meßpunkte gut interpolieren.

Auch das im Graphik-Betriebssystem des Hewlett-Packard-Rechners inkorporierte Interpolations-Unterprogramm "Plot" eignet sich zur Interpolation nicht-normalverteilter Meßwerte (Programme siehe Kapitel VII): die gemessenen Werte werden hierbei mit ausgefüllten Symbolen ($\blacktriangle$), die berechneten Werte entsprechend mit nicht-ausgefüllten Symbolen ($\triangle$) vom Drucker in die graphischen Darstellungen eingezeichnet.

Durch Verwendung numerischer Interpolationsmethoden lassen sich die Schnittpunkte und damit die Zahl der Rezeptoren/Erythrozyt mit einer Genauigkeit von etwa 10-15 % bestimmen. Zur weiteren Erhöhung der Meßgenauigkeit sollten jedoch bei zukünftigen Studien noch weitere Messungen bei Insulin-Konzentrationen zwischen 10^2 und 10^4 $\mu\text{E/ml}$ eingeplant werden. Die Zahl der Messungen zwischen 0 und 10^2 $\mu\text{E/ml}$ unmarkiertem Insulin könnten

reduziert werden

Da in alle Meßpunkte des 'average affinity plots' der Schnittpunkt R_0 der Scatchard-Darstellung als systematischer Fehler eingeht, (siehe Formel (7) im Abschnitt III.2.5), sind die Meßpunkte dieser Kurve mit einem Gesamtfehler behaftet, der sich nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den bei der Ermittlung des Schnittpunkts R_0 und aus den bei den Messungen der Einzelwerte gemachten Fehlern zusammensetzt.

Daraus läßt sich erkennen, daß die Bestimmung des Nulldurchgangs der Scatchard-Kurve das zentrale Problem der beiden graphischen Auswerteverfahren darstellt und daß man bei Angaben über die Affinität der Insulinrezeptoren eine erhebliche Fehlerbreite von mindestens 15-20 % einkalkulieren muß.

- 4) Inwieweit unter den realen Bedingungen einer Messung die idealen Bedingungen eingehalten werden, die den graphischen Auswerteverfahren zugrunde liegen (thermodynamisches Gleichgewicht, reversible Bindung ohne Hysterese-Effekte, Bindung eines Insulinmoleküls/Rezeptor, keine bindungsähnliche Adhäsion von Insulin an Strukturen der Erythrozytenoberfläche, die per definitionem keine Rezeptoren sind, keine Aneinanderlagerung mehrerer Insulinmoleküle) ist noch weitgehend unbekannt und kann deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschätzt werden (siehe z.B. (181)).

Ein systematischer Fehler bei der Bestimmung der spezifischen Bindung tritt auf, wenn der vom -Zähler registrierte Rauschanteil (noise) bei der Messung nicht berücksichtigt wird. Dieser "radioaktive Hintergrund" setzt sich aus all den vom Zähler registrierten Zerfallsereignissen zusammen, die nicht von dem im Versuch eingesetzten radioaktiven Tracer verursacht werden. Den größten Einfluß auf die Höhe dieses Rauschanteils hat sicher die radioaktive Kontamination des Zählers, die bei wenig gepflegten und unsorgfältig bedienten Zählapparaten und Zählröhrchen erhebliche Ausmaße annehmen kann. Daneben spielt die natürliche

hebliche Ausmaße annehmen kann. Daneben spielt die natürliche Umweltstrahlung, Spontanionisation und das Rauschen der Zähl-elektronik (Elektronenrauschen) eine Rolle.

Dieser Anteil an der insgesamt registrierten Strahlung kann durch Messung der angezeigten Radioaktivität leerer Zählröhrchen ermittelt werden, Diese Untergrundaktivität sollte von der insgesamt gemessenen Radioaktivität subtrahiert werden, wodurch sich Gleichung (2) im Abschnitt III.2.5 folgendermaßen ändert:

$$B_s = \frac{B_G - N}{G - N} = \frac{U - N}{G - N} = \frac{B_G - N - U + N}{G - N} = \frac{B_G - U}{G - N} \quad (2')$$

mit: B_s : spezifische Bindung. B_G : Gebundene, vom Zähler angezeigte Radioaktivität (Zahl der Zerfälle/Zeit); G: Gesamte in dem Inkubationsansatz eingesetzte Radioaktivität (Zerfälle/Zeit). U: Vom unspezifisch gebundenen Tracer herrührende Radioaktivität (Zerfälle/Zeit).

Diese Gleichung (2') unterscheidet sich um den Wert N von der ursprünglichen Gleichung (2):

$$\frac{B - U}{G}$$

Zusammenfassung der Fehleinschätzung:

Von allen diesen aufgeführten systematischen und zufälligen Fehlern sind sicher die relativen Fehler bei der Messung der Höhe der spezifischen Bindung mit 5 - 8 % noch einigermaßen gering.

Dazu kommen jedoch bei der graphischen Auswertung gravierende Fehler, die den **gesamten Meßfehler** bei der Ermittlung der Zahl der Rezeptoren und ihrer Affinität auf 20 % - 25 % vergrößern.

VII. Die Rechenprogramme zur vollautomatischen graphischen Darstellung und Auswertung der Bindungsdaten

Die folgenden Programme wurden in dem für den vorhandenen Rechner* verarbeitbaren, speziellen Basic geschrieben.

Programm 1: Graphische Darstellung der spezifischen Bindungen.

Dieses Programm, das auf dem Programmspeicherplatz -0 abgespeichert ist, zeichnet die spezifische Bindung auf. Dazu sind die gemessenen (spezifischen) Bindungswerte, beginnend mit dem nur bei Anwesenheit von radioaktivem Insulin gemessenen Wert in die Speicher J einzuspeichern. Durch den Tastenbefehl 'run' läuft dann das Programm selbständig ab.

Das Programm im Einzelnen:

Durch die Programmbefehle 0 bis 95 wird das Koordinatenkreuz sowie die Skalierung der Achsen, durch die weiteren Befehle (bis Nr. 693) wird die Beschriftung des Diagramms gesteuert.

Die Programmschritte 702 bis 754 speichern die in die Experimente eingesetzten Insulinmengen in die Register 41 bis 49. Anschließend bis Schritt 793 wird die Bindungskurve berechnet und gezeichnet.

Sollen zu Vergleichszwecken in ein Diagramm mehrere Kurvenverläufe (insgesamt max. 3) eingezeichnet werden, so sind deren Bindungswerte in die Speicher 11 bis 19 bzw. 21 bis 29 einzuspeichern. Durch den Tastenbefehl 'run' werden dann diese Kurven jeweils berechnet und mit unterschiedlichen Symbolen in dasselbe Koordinatensystem eingetragen.

* Tischrechner Hewlett-Packard, Modell 9815 A mit Plotter Modell 98131 A

FILE -0
 TYPE 0
 USED 899
 MAX 1000

0000 2
 0001 7
 0002 WBYTE 3
 0004 6
 0005 9
 0006 WBYTE 3
 0008 0
 0009 ENTER↑
 0010 6
 0011 ENTER↑
 0012 1
 0013 0
 0014 CSPC 3
 0016 9
 0017 .
 0018 5
 0019 ENTER↑
 0020 1
 0021 1
 0022 PAPER 3
 0024 1
 0025 .
 0026 5
 0027 ENTER↑
 0028 2
 0029 ENTER↑
 0030 7
 0031 ENTER↑
 0032 6
 0033 PSIZE 3
 0035 2
 0036 +÷-
 0037 ENTER↑
 0038 4
 0039 ENTER↑
 0040 0
 0041 ENTER↑
 0042 1
 0043 1
 0044 SCALE 3
 0046 2
 0047 +÷-
 0048 ENTER↑
 0049 4
 0050 .
 0051 1
 0052 ENTER↑

0053 0
 0054 ENTER↑
 0055 0
 0056 XAXIS 3
 0058 0
 0059 ENTER↑
 0060 1
 0061 1
 0062 ENTER↑
 0063 1
 0064 ENTER↑
 0065 2
 0066 +÷-
 0067 YAXIS 3
 0069 0
 0070 STO A
 0071 2
 0072 .
 0073 2
 0074 5
 0075 +÷-
 0076 STO B
 0077 1
 0078 0
 0079 STO F
 0080 FIX 0
 0082 2
 0083 FIELD 3
 0085 FOR A÷F
 0086 RCL A
 0087 RCL B
 0088 MOVE 3
 0090 X÷Y
 0091 PRNT* 3
 0093 PRINT
 0094 END*
 0095 NEXT A
 0096 1
 0097 0
 0098 .
 0099 8
 0100 RCL B
 0101 MOVE 3
 0103 3
 0104 FIELD 3
 0106 9
 0107 1
 0108 WBYTE 3
 0110 3
 0111 7
 0112 WBYTE 3
 0114 9
 0115 3
 0116 WBYTE 3
 0118 1
 0119 0

0120 .
 0121 5
 0122 ENTER↑
 0123 0
 0124 MOVE 3
 0126 0
 0127 ENTER↑
 0128 6
 0129 ENTER↑
 0130 7
 0131 CSPC 3
 0133 PRNT* 3
 0135 S
 0136 P
 0137 E
 0138 C
 0139 I
 0140 F
 0141 I
 0142 C
 0143
 0144 B
 0145 I
 0146 N
 0147 D
 0148 I
 0149 N
 0150 G
 0151 END*
 0152 9
 0153 .
 0154 7
 0155 ENTER↑
 0156 0
 0157 MOVE 3
 0159 0
 0160 ENTER↑
 0161 6
 0162 ENTER↑
 0163 1
 0164 0
 0165 CSPC 3
 0167 PRNT* 3
 0169 N
 0170 U
 0171 N
 0172 B
 0173 E
 0174 R
 0175
 0176 0
 0177 F
 0178
 0179 P
 0180 A
 0181 T

0182	I		0243	STO	G	0310	1	
0183	E		0244	FOR	B+G	0311	0	
0184	N		0245	RCL	B	0312	9	
0185	T		0246	0		0313	WBYTE	3
0186	S		0247	IF X=Y		0315	1	
0187	:		0248	GOTO	A	0316	0	
0188	END*		0250	RCL	E	0317	8	
0189	RCL	J	0251	RCL	B	0318	WBYTE	3
0190	PRNT*	3	0252	.		0320	9	
0192	PRINT		0253	3		0321	3	
0193	END*		0254	-		0322	WBYTE	3
0194	1		0255	LBL		0324	2	
0195	.		-----	B		0325	+*-	
0196	4		0257	MOVE	3	0326	STO	A
0197	+*-		0259	GOTO	C	0327	3	
0198	ENTER↑		0261	LBL		0328	STO	F
0199	0		-----	A		0329	0	
0200	.		0263	RCL	E	0330	STO	B
0201	1		0264	0		0331	.	
0202	MOVE	3	0265	.		0332	1	
0204	PRNT*	3	0266	4		0333	3	
0206	I		0267	+*-		0334	STO	C
0207	N		0268	GOTO	B	0335	FOR	A+F
0208	S		0270	LBL		0336	RCL	C
0209	U		-----	C		0337	RCL	A
0210	L		0272	1		0338	MOVE	3
0211	I		0273	0		0340	1	
0212	N		0274	RCL	B	0341	2	
0213			0275	Y↑X		0342	4	
0214	C		0276	1		0343	WBYTE	3
0215	0		0277	X≠Y		0345	1	
0216	N		0278	IF X≠Y		0346	STO	B
0217	C		0279	FIX	0	0347	1	
0218	E		0281	PRNT*	3	0348	0	
0219	N		0283	PRINT		0349	STO	G
0220	T		0284	END*		0350	FOR	B+G
0221	R		0285	NEXT	B	0351	RCL	A
0222	A		0286	RCL	E	0352	RCL	B
0223	T		0287	3		0353	LOG	
0224	I		0288	.		0354	+	
0225	0		0289	6		0355	0	
0226	N		0290	MOVE	3	0356	X≠Y	
0227	END*		0292	9		0357	MOVE	
0228	FIX	2	0293	1		0359	PRNT*	3
0230	6		0294	WBYTE	3	0361	SHIFT	
0231	FIELD	3	0296	1		0362	%	
0233	0		0297	1		0363	END*	
0234	.		0298	0		0364	NEXT	B
0235	5		0299	WBYTE	3	0365	NEXT	A
0236	5		0301	1		0366	1	
0237	+*-		0302	0		0367	0	
0238	STO	E	0303	3		0368	.	
0239	2		0304	WBYTE	3	0369	5	
0240	+*-		0306	4		0370	ENTER↑	
0241	STO	B	0307	7		0371	2	
0242	3		0308	WBYTE	3	0372	.	

0373	7			0443	9			0508	MOVE	3
0374	+@-			0444	ENTER↑			0510	PRNTα	3
0375	STO	A		0445	2			0512	N	
0376	MOVE	3		0446	.			0513	ENDα	
0378	PRNTα	3		0447	9			0514	6	
0380	P			0448	4			0515	.	
0381	ENDα			0449	+@-			0516	3	
0382	1			0450	MOVE	3		0517	RCL	A
0383	0			0452	0			0518	MOVE	3
0384	.			0453	ENTER↑			0520	PRNTα	3
0385	2			0454	6			0522	8	
0386	RCL	A		0455	ENTER↑			0523	ENDα	
0387	MOVE	3		0456	2			0524	6	
0389	PRNTα	3		0457	0			0525	.	
0391	E			0458	CSPC	3		0526	0	
0392	ENDα			0450	1			0527	RCL	A
0393	9			0461	2			0528	MOVE	3
0394	.			0462	5			0530	PRNTα	3
0395	9			0463	PRNTα	3		0532	U	
0396	RCL	A		0465	PRINT			0533	ENDα	
0397	MOVE	3		0466	ENDα			0534	5	
0399	PRNTα	3		0467	7			0535	.	
0401	R			0468	.			0536	7	
0402	ENDα			0469	7			0537	RCL	A
0403	9			0470	5			0538	MOVE	3
0404	.			0471	ENTER↑			0540	PRNTα	3
0405	6			0472	2			0542	L	
0406	RCL	A		0473	.			0543	ENDα	
0407	MOVE	3		0474	6			0544	5	
0409	PRNTα	3		0475	1			0545	.	
0411	C			0476	+@-			0546	4	
0412	ENDα			0477	MOVE	3		0547	RCL	A
0413	9			0479	PRNTα	3		0548	MOVE	3
0414	.			0481	J			0550	PRNTα	3
0415	3			0482	ENDα			0552	1	
0416	RCL	A		0483	7			0553	ENDα	
0417	MOVE	3		0484	.			0554	5	
0419	PRNTα	3		0485	6			0555	.	
0421	E			0486	RCL	A		0556	1	
0422	ENDα			0487	MOVE	3		0557	RCL	A
0423	9			0489	PRNTα	3		0558	MOVE	3
0424	RCL	A		0491	SHIFT			0560	PRNTα	3
0425	MOVE	3		0492	#			0562	N	
0427	PRNTα	3		0493	ENDα			0563	ENDα	
0429	N			0494	6			0564	4	
0430	ENDα			0495	.			0565	.	
0431	8			0496	9			0566	5	
0432	.			0497	RCL	A		0567	RCL	A
0433	7			0498	MOVE	3		0568	MOVE	3
0434	RCL	A		0500	PRNTα	3		0570	PRNTα	3
0435	MOVE	3		0502	I			0572	8	
0437	PRNTα	3		0503	ENDα			0573	ENDα	
0439	T			0504	6			0574	4	
0440	ENDα			0505	.			0575	.	
0441	7			0506	6			0576	2	
0442	.			0507	RCL	A		0577	RCL	A

0574	MOVE	3	0648	MOVE	3	0718	STO	R043
0582	PRNT%	3	0650	PRNT%	3	0720	.	
0582	F		0652	B		0721	4	
0583	END%		0653	END%		0722	4	
0584	3		0654	1		0723	STO	R044
0585	.		0655	.		0725	2	
0586	5		0656	5		0726	.	
0587	RCL	A	0657	RCL	A	0727	0	
0588	MOVE	3	0658	MOVE	3	0728	4	
0590	PRNT%	3	0660	PRNT%	3	0729	STO	R045
0592	E		0662	0		0731	4	
0593	END%		0663	END%		0732	.	
0594	3		0664	1		0733	0	
0595	.		0665	.		0734	4	
0596	6		0666	2		0735	STO	R046
0597	RCL	A	0667	RCL	A	0737	2	
0598	MOVE	3	0668	MOVE	3	0738	0	
0600	PRNT%	3	0670	PRNT%	3	0739	.	
0602	C		0672	U		0740	0	
0603	END%		0673	END%		0741	4	
0604	3		0674	0		0742	STO	R047
0605	.		0675	.		0744	4	
0606	3		0676	9		0745	0	
0607	RCL	A	0677	RCL	A	0746	.	
0608	MOVE	3	0678	MOVE	3	0747	0	
0610	PRNT%	3	0680	PRNT%	3	0748	4	
0612	1		0682	H		0749	STO	R048
0613	END%		0683	END%		0751	4	
0614	3		0684	0		0752	0	
0615	.		0685	.		0753	0	
0616	0		0686	6		0754	STO	R049
0617	RCL	A	0687	RCL	A	0756	1	
0618	MOVE	3	0688	MOVE	3	0757	STO	A
0620	PRNT%	3	0690	PRNT%	3	0758	9	
0622	F		0692	D		0759	STO	F
0623	END%		0693	END%		0760	FOR	A+F
0624	2		0694	0		0761	RCL	A
0625	.		0695	ENTER↑		0762	1	
0626	7		0696	ENTER↑		0763	IF X=Y	
0627	RCL	A	0697	1		0764	GOTO	L01
0628	MOVE	3	0698	1		0766	2	
0630	PRNT%	3	0699	1		0767	0	
0632	I		0700	CHAR	3	0768	ENTER↑	
0633	END%		0702	5		0769	4	
0634	2		0703	0		0770	2	
0635	.		0704	#REGS		0771	ENTER↑	
0636	4		0705	.		0772	1	
0637	RCL	A	0706	0		0773	1	
0638	MOVE	3	0707	4		0774	1	
0640	PRNT%	3	0708	STO	R041	0775	CHAR	3
0642	C		0710	.		0777	LBL	
0643	END%		0711	1		----	01	
0644	1		0712	4		0779	RCL	A
0645	.		0713	STO	R042	0780	4	
0646	3		0715	.		0781	0	
0647	RCL	A	0716	2		0782	+	
			0717	4		0783	STO	R000

0785	RCL	I	A	0853	2
0787	RCL	I	R000	0854	9
0789	LOG			0855	STO F
0790	PLOT	3		0856	FOR A→F
0792	NEXT	A		0857	RCL A
0793	STOP			0858	2
0794	0			0859	1
0795	ENTER↑			0860	IF X=Y
0796	ENTER↑			0861	GOTO L03
0797	1			0863	2
0798	2			0864	0
0799	0			0865	ENTER↑
0800	CHAR	3		0866	3
0802	1			0867	4
0803	1			0868	ENTER↑
0804	STO	A		0869	4
0805	1			0870	8
0806	9			0871	CHAR 3
0807	STO	F		0873	LBL
0808	FOR	A→F		----	03
0809	RCL	A		0875	RCL A
0810	1			0876	2
0811	1			0877	0
0812	IF X=Y			0878	+
0813	GOTO	L02		0879	STO R000
0815	2			0881	RCL I A
0816	0			0883	RCL I R000
0817	ENTER↑			0885	LOG
0818	4			0886	PLOT 3
0819	6			0888	NEXT A
0820	ENTER↑			0889	1
0821	1			0890	.
0822	2			0891	5
0823	0			0892	+÷-
0824	CHAR	3		0893	ENTER↑
0826	LBL			0894	3
----	02			0895	+÷-
0828	RCL	A		0896	MOVE 3
0829	3			0898	END
0830	0				
0831	+				
0832	STO	R000			
0834	RCL	I	A		
0836	RCL	I	R000		
0838	LOG				
0839	PLOT	3			
0841	NEXT	A			
0842	STOP				
0843	0				
0844	ENTER↑				
0845	ENTER↑				
0846	4				
0847	8				
0848	CHAR	3			
0850	2				
0851	1				
0852	STO	A			

Programm 2: S c a t c h a r d - D a r s t e l l u n g

Dieses auf dem Programmspeicherplatz -1 abgespeicherte Rechenprogramm dient dazu, im Anschluß an Programm 1 die gemessenen Bindungswerte in der von Scatchard (157) angegebenen Weise darzustellen, wodurch die Zahl der Rezeptoren pro Erythrozyt ermittelt werden kann.

Das Programm im Einzelnen:

Die Rechenschritte 0 bis 52 werden zur Konstruktion, die folgenden Schritte (bis Schritt 164) zur Skalierung und Beschriftung der X-Achse benötigt. Die folgenden Schritte bis (242) enthalten dieselbe Information für die y-Achse. Durch die Programmbefehle 243 bis 430 wird die restliche Beschriftung des Diagramms sichergestellt.

Nach der Einspeicherung der in die vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Insulinmengen in die Register 41 bis 49 (Programmbefehle 440 bis 492) werden in den nächsten 65 Rechenschritten (Nr. 494 bis 559) die Meßpunkte der Scatchard-Kurve sowie die Zwischenwerte berechnet und aufgezeichnet. Weitere Kurven werden mit unterschiedlichen Symbolen in dasselbe Koordinatensystem eingetragen, wenn das Programm mit der Taste 'run' erneut gestartet wird und die entsprechenden Bindungswerte in den Speichern 11 bis 19 bzw. 21 bis 29 gespeichert sind.

FILE	-1	0056	1	0119	.		
TYPE	0	0057	3	0120	3		
USED	725	0058	STO	F	0121	MOVE	3
MAX	1000	0059	.		0123	PRNT α	3
		0060	3		0125	SHIFT	
		0061	STO	C	0126	(	
		0062	FOR	A+F	0127	N	
0000	2	0063	RCL	C	0128	G	
0001	7	0064	RCL	A	0129	)	
0002	WBYTE	0065	1		0130	END α	
0004	6	0066	0		0131	1	
0005	9	0067	÷		0132	.	
0006	WBYTE	0068	MOVE	3	0133	3	
0008	0	0070	PRNT α	3	0134	+ $\pm$ -	
0009	ENTER↑	0072	SHIFT		0135	ENTER↑	
0010	6	0073	%		0136	0	
0011	ENTER↑	0074	END α		0137	.	
0012	1	0075	NEXT	A	0138	5	
0013	0	0076	0		0139	MOVE	3
0014	CSPC	0077	STO	A	0141	0	
0016	9	0078	6		0142	ENTER↑	
0017	.	0079	STO	F	0143	6	
0018	5	0080	0		0144	ENTER↑	
0019	ENTER↑	0081	.		0145	1	
0020	1	0082	4		0146	0	
0021	1	0083	+ $\pm$ -		0147	CSPC	3
0022	PAPER	0084	STO	C	0149	PRNT α	3
0024	1	0085	FIX	1	0151	I	
0025	.	0087	3		0152	N	
0026	4	0088	FIELD	3	0153	S	
0027	ENTER↑	0090	0		0154	U	
0028	2	0091	ENTER↑		0155	L	
0029	ENTER↑	0092	6		0156	I	
0030	7	0093	ENTER↑		0157	N	
0031	ENTER↑	0094	8		0158		
0032	6	0095	CSPC	3	0159	B	
0033	PSIZE	0097	FOR	A+F	0160	0	
0035	0	0098	RCL	C	0161	U	
0036	ENTER↑	0099	RCL	A	0162	N	
0037	1	0100	5		0163	D	
0038	.	0101	÷		0164	END α	
0039	3	0102	0		0165	0	
0040	ENTER↑	0103	.		0166	ENTER↑	
0041	0	0104	0		0167	1	
0042	ENTER↑	0105	1		0168	1	
0043	1	0106	-		0169	ENTER↑	
0044	1	0107	MOVE	3	0170	1	
0045	SCALE	0109	RCL	A	0171	ENTER↑	
0047	ROLL↓	0110	5		0172	0	
0048	ROLL↓	0111	÷		0173	YAXIS	3
0049	0	0112	PRNT α	3	0175	0	
0050	ENTER↑	0114	PRINT		0176	STO	A
0051	0	0115	END α		0177	1	
0052	XAXIS	0116	NEXT	A	0178	1	
0054	1	0117	RCL	C	0179	STO	F
0055	STO	0118	1		0180	0	

0181 .		0245 .		0307 0	
0182 0		0246 8		0308 F	
0183 6		0247 ENTER↑		0309	
0184 +÷-		0248 0		0310 P	
0185 STO	D	0249 .		0311 A	
0186 FIX	0	0250 4		0312 T	
0188 2		0251 2		0313 I	
0189 FIELD	3	0252 MOVE	3	0314 E	
0191 FOR	A→F	0254 0		0315 N	
0192 RCL	A	0255 ENTER↑		0316 T	
0193 RCL	D	0256 6		0317 S	
0194 MOVE	3	0257 ENTER↑		0318 :	
0196 X÷Y		0258 7		0319 ENDα	
0197 PRNTα	3	0259 CSPC	3	0320 RCL	J
0199 PRINT		0261 PRNTα	3	0321 PRNTα	3
0200 ENDα		0263 S		0323 PRINT	
0201 NEXT	A	0264 C		0324 ENDα	
0202 1		0265 A		0325 8	
0203 1		0266 T		0326 .	
0204 :		0267 C		0327 5	
0205 3		0268 H		0328 ENTER↑	
0206 ENTER↑		0269 A		0329 0	
0207 0		0270 R		0330 .	
0208 .		0271 D		0331 1	
0209 1		0272		0332 5	
0210 7		0273		0333 +÷-	
0211 +÷-		0274 P		0334 STO	A
0212 MOVE	3	0275 L		0335 MOVE	3
0214 PRNTα	3	0276 0		0337 PRNTα	3
0216 (		0277 T		0339 B	
0217 *		0278 ENDα		0340 ENDα	
0218 1		0279 1		0341 8	
0219 0		0280 0		0342 .	
0220		0281 .		0343 2	
0221		0282 1		0344 RCL	A
0222)		0283 ENTER↑		0345 MOVE	3
0223 ENDα		0284 0		0347 PRNTα	3
0224 1		0285 .		0349 0	
0225 1		0286 4		0350 ENDα	
0226 .		0287 2		0351 7	
0227 4		0288 MOVE	3	0352 .	
0228 5		0290 0		0353 9	
0229 ENTER↑		0291 ENTER↑		0354 RCL	A
0230 0		0292 6		0355 MOVE	3
0231 .		0293 ENTER↑		0357 PRNTα	3
0232 0		0294 1		0359 U	
0233 9		0295 0		0360 ENDα	
0234 4		0296 CSPC	3	0361 7	
0235 +÷-		0298 PRNTα	3	0362 .	
0236 MOVE	3	0300 N		0363 6	
0238 PRNTα	3	0301 U		0364 RCL	A
0240 -		0302 M		0365 MOVE	3
0241 2		0303 B		0367 PRNTα	3
0242 ENDα		0304 E		0369 N	
0243 1		0305 R		0370 ENDα	
0244 0		0306		0371 7	

0372 .		0441 0		0507 4	
0373 3		0442 #REGS		0508 2	
0374 RCL A		0443 .		0509 ENTER↑	
0375 MOVE 3		0444 0		0510 1	
0377 PRNTα 3		0445 4		0511 1	
0379 D		0446 STO R041		0512 1	
0380 ENDα		0448 .		0513 CHAR 3	
0381 6		0449 1		0515 LBL	
0382 .		0450 4		---- 01	
0383 8		0451 STO R042		0517 1	
0384 5		0453 .		0518 0	
0385 RCL A		0454 2		0519 0	
0386 MOVE 3		0455 4		0520 RCL I A	
0388 PRNTα 3		0456 STO R043		0522 -	
0390 /		0458 .		0523 LSTX	
0391 ENDα		0459 4		0524 X÷Y	
0392 6		0460 4		0525 +	
0393 .		0461 STO R044		0526 1	
0394 3		0463 2		0527 0	
0395 RCL A		0464 .		0528 0	
0396 MOVE 3		0465 0		0529 *	
0398 PRNTα 3		0466 4		0530 RCL A	
0400 F		0467 STO R045		0531 4	
0401 ENDα		0469 4		0532 0	
0402 6		0470 .		0533 +	
0403 .		0471 0		0534 STO R000	
0404 0		0472 4		0536 RCL I R000	
0405 RCL A		0473 STO R046		0538 RCL I A	
0406 MOVE 3		0475 2		0540 *	
0408 PRNTα 3		0476 0		0541 1	
0410 R		0477 .		0542 0	
0411 ENDα		0478 0		0543 0	
0412 5		0479 4		0544 ÷	
0413 .		0480 STO R047		0545 X÷Y	
0414 7		0482 4		0546 ROLL↓	
0415 RCL A		0483 0		0547 1	
0416 MOVE 3		0484 .		0548 .	
0418 PRNTα 3		0485 0		0549 6	
0420 E		0486 4		0550 IF X<Y	
0421 ENDα		0487 STO R048		0551 GOTO L04	
0422 5		0489 4		0553 ROLL↓	
0423 .		0490 0		0554 PLOT 3	
0424 4		0491 0		0556 NEXT A	
0425 RCL A		0492 STO R049		0557 LBL	
0426 MOVE 3		0494 1		---- 04	
0428 PRNTα 3		0495 STO A		0559 STOP	
0430 E		0496 9		0560 0	
0431 ENDα		0497 STO F		0561 ENTER↑	
0432 0		0498 FOR A÷F		0562 ENTER↑	
0433 ENTER↑		0499 RCL A		0563 1	
0434 ENTER↑		0500 1		0564 2	
0435 1		0501 IF X=Y		0565 0	
0436 1		0502 GOTO L01		0566 CHAR 3	
0437 1		0504 2		0568 1	
0438 CHAR 3		0505 0		0569 1	
0440 5		0506 ENTER↑		0570 STO A	

0571 1			0636 NEXT A	0699 ÷
0572 9			0637 LBL	0700 X≠Y
0573 STO F			---- 05	0701 ROLL↓
0574 FOR A→F			0639 STOP	0702 0
0575 RCL A			0640 0	0703 .
0576 1			0641 ENTER↑	0704 8
0577 1			0642 ENTER↑	0705 5
0578 IF X=Y			0643 4	0706 IF X<Y
0579 GOTO L02			0644 8	0707 GOTO L06
0581 2			0645 CHAR 3	0709 ROLL↓
0582 0			0647 2	0710 PLOT 3
0583 ENTER↑			0648 1	0712 NEXT A
0584 4			0649 STO A	0713 LBL
0585 6			0650 2	---- 06
0586 ENTER↑			0651 9	0715 2
0587 1			0652 STO F	0716 +÷-
0588 2			0653 FOR A→F	0717 ENTER↑
0589 ●			0654 RCL A	0718 0
0590 CHAR 3			0655 2	0719 .
0592 LBL			0656 1	0720 1
---- 02			0657 IF X=Y	0721 +÷-
0594 1			0658 GOTO L03	0722 MOVE 3
0595 0			0660 2	0724 END
0596 0			0661 0	
0597 RCL I A			0662 ENTER↑	
0599 -			0663 3	
0600 LSTX			0664 4	
0601 X≠Y			0665 ENTER↑	
0602 ÷			0666 4	
0603 1			0667 8	
0604 0			0668 CHAR 3	
0605 0			0670 LBL	
0606 *			---- 03	
0607 RCL A			0672 1	
0608 3			0673 0	
0609 0			0674 0	
0610 +			0675 RCL I A	
0611 STO R000			0677 -	
0613 RCL I R000			0678 LSTX	
0615 RCL I A			0679 X≠Y	
0617 *			0680 ÷	
0618 1			0681 1	
0619 0			0682 0	
0620 0			0683 0	
0621 ÷			0684 *	
0622 X≠Y			0685 RCL A	
0623 ROLL↓			0686 2	
0624 0			0687 0	
0625 .			0688 +	
0626 8			0689 STO R000	
0627 5			0691 RCL I R000	
0628 IF X<Y			0693 RCL I A	
0629 GOTO L05			0695 *	
0631 ROLL↓			0696 1	
0632 PLOT 3			0697 0	
0634 PLOT 3			0698 0	

Programm 3: Average Affinity Plot

Dieses Programm, das von dem Programmspeicherplatz -2 aufgerufen werden kann, berechnet die Affinität der Rezeptoren in Abhängigkeit von dem Grad ihrer Besetzung.

Durch die Schritte 0 bis 100 wird die y-Achse sowie deren logarithmische Einteilung konstruiert. Im Anschluß daran wird diese beschriftet (bis Befehl 226). Die Angaben über die y-Achse, ihrer dekadischen Einteilung und ihre Beschriftung erfolgt durch die folgenden Befehle (bis 558).

Da ja in die Berechnung der Affinität die aus dem Scatchard-Plot ermittelte maximale Bindungskapazität R_0 [ng] eingeht, wird diese vom Rechner mit der Frage: "Wert für R_0 ng?" abgefragt. Nach der Eingabe dieses Wertes wird das Programm durch Betätigung der 'run'-Taste fortgesetzt.

Die Rechenschritte 595 bis 647 speichern wieder die in die Versuche eingesetzten Insulinmengen in die Speicherplätze 41 bis 49.

Die Programmschritte 651 bis 675 ermöglichen es, zwischen 2 Formeln zur Berechnung der Rezeptoraffinität zu wählen: Durch Wahl der Formel 2 wird die von de Meyts et al. (173) entwickelte Formel, mit der auch alle Berechnungen für diese Arbeit erfolgten, aufgerufen.

Unter Formel 1 ist eine etwas modifizierte Rechenvorschrift, die von Gambhir et al. (69) angegeben wurde, gespeichert. Sie hält einer strengen mathematischen Herleitung jedoch nicht stand und wird deshalb auch nicht näher besprochen.

Bei der Wahl der Formel 2 springt der Rechner direkt in das mit der Marke (Label) F gekennzeichnete Unterprogramm, das mit den Befehlen 765 bis 857 die Berechnung und Zeichnung der eigentlichen Meßpunkte sowie der entsprechenden Zwischenwerte steuert.

Soll zu Vergleichszwecken eine 2. Kurve in das average-affinity Schaubild eingetragen werden, so werden durch Betätigung der 'run'-Taste die noch folgenden Programmbefehle ausgeführt und mit den auf den Speicherplätzen 11 bis 19 stehenden Bindungswerten eine 2. Kurve berechnet und unter Verwendung anderer Zeichensymbolen gezeichnet.

FILE	-2	0055	1	0119	RCL	E
TYPE	0	0056	+@-	0120	RCL	B
USED	960	0057	STO A	0121	MOVE	3
MAX	1000	0058	2	0123	1	
		0059	STO F	0124	0	
		0060	0	0125	RCL	B
		0061	STO B	0126	Y↑X	
		0062	.	0127	STO	D
		0063	1	0128	.	
0000	2	0064	STO C	0129	8	
0001	7	0065	FOR A+F	0130	IF X<Y	
0002	WBYTE 3	0066	RCL C	0131	FIX	0
0004	6	0067	RCL A	0133	RCL	D
0005	9	0068	MOVE 3	0134	1	
0006	WBYTE 3	0070	PRNT% 3	0135	IF X=Y	
0008	0	0072	SHIFT	0136	GOTO	B
0009	ENTER↑	0073	%	0138	LBL	
0010	6	0074	END%	----	C	
0011	ENTER↑	0075	1	0140	RCL	D
0012	1	0076	STO B	0141	PRNT%	3
0013	0	0077	1	0143	PRINT	
0014	CSPC 3	0078	0	0144	END%	
0016	9	0079	STO G	0145	NEXT	B
0017	.	0080	2	0146	GOTO	D
0018	5	0081	RCL A	0148	LBL	
0019	ENTER↑	0082	IF X=Y	----	B	
0020	1	0083	GOTO A	0150	1	
0021	1	0085	FOR B+G	0151	FIELD	3
0022	PAPER 3	0086	RCL A	0153	GOTO	C
0024	1	0087	RCL B	0155	LBL	
0025	.	0088	LOG	----	D	
0026	7	0089	+	0157	1	
0027	ENTER↑	0090	0	0158	.	
0028	2	0091	X≠Y	0159	1	
0029	ENTER↑	0092	MOVE 3	0160	+@-	
0030	7	0094	PRNT% 3	0161	ENTER↑	
0031	ENTER↑	0096	SHIFT	0162	0	
0032	6	0097	%	0163	.	
0033	PSIZE 3	0098	END%	0164	3	
0035	1	0099	NEXT B	0165	+@-	
0036	+@-	0100	NEXT A	0166	MOVE	3
0037	ENTER↑	0101	LBL	0168	0	
0038	2	----	A	0169	ENTER↑	
0039	.	0103	0	0170	6	
0040	3	0104	.	0171	ENTER↑	
0041	ENTER↑	0105	5	0172	8	
0042	0	0106	+@-	0173	CSPC	3
0043	ENTER↑	0107	STO E	0175	PRNT%	3
0044	1	0108	1	0177	F	
0045	0	0109	+@-	0178	R	
0046	SCALE 3	0110	STO B	0179	A	
0048	ROLL↓	0111	FIX 1	0180	C	
0049	ROLL↓	0113	2	0181	T	
0050	0	0114	STO G	0182	I	
0051	ENTER↑	0115	FOR B+G	0183	0	
0052	0	0116	3	0184	N	
0053	XAXIS 3	0117	FIELD 3	0185	A	

0136 L	0247 STO	A	0310 CSPC	3
0137	0248 1		0312 9	
0138 R	0249 0		0313 .	
0139 E	0250 STO	F	0314 7	
0190 C	0251 FOR	A+F	0315 5	
0191 E	0252 RCL	A	0316 ENTER↑	
0192 P	0253 1		0317 0	
0193 T	0254 .		0318 MOVE	3
0194 0	0255 1		0320 PRNT↖	3
0195 R	0256 8		0322 A	
0196	0257 +↖-		0323 V	
0197 0	0258 MOVE	3	0324 E	
0198 C	0260 X↖Y		0325 R	
0199 C	0261 PRNT↖	3	0326 A	
0200 U	0263 PRINT		0327 G	
0201 P	0264 END↖		0328 E	
0202 A	0265 NEXT	A	0329	
0203 N	0266 9		0330 A	
0204 C	0267 .		0331 F	
0205 Y	0268 5		0332 F	
0206	0269 ENTER↑		0333 I	
0207 (	0270 1		0334 N	
0208 Y	0271 .		0335 I	
0209)	0272 4		0336 T	
0210 END↖	0273 4		0337 Y	
0211 0	0274 +↖-		0338	
0212 .	0275 MOVE	3	0339 P	
0213 3	0277 PRNT↖	3	0340 L	
0214 +↖-	0279 (		0341 0	
0215 ENTER↑	0280 *		0342 T	
0216 2	0281 1		0343 END↖	
0217 .	0282 0		0344 0	
0218 2	0283		0345 ENTER↑	
0219 MOVE	0284		0346 6	
0221 PRNT↖	0285)		0347 ENTER↑	
0223 (	0286 END↖		0348 1	
0224 %	0287 9		0349 0	
0225)	0288 .		0350 CSPC	3
0226 END↖	0289 5		0352 9	
0227 0	0290 7		0353 .	
0228 ENTER↑	0291 ENTER↑		0354 1	
0229 1	0292 1		0355 ENTER↑	
0230 0	0293 .		0356 0	
0231 ENTER↑	0294 2		0357 MOVE	3
0232 1	0295 6		0359 PRNT↖	3
0233 ENTER↑	0296 5		0361 N	
0234 1	0297 +↖-		0362 U	
0235 +↖-	0298 MOVE	3	0363 M	
0236 YAXIS	0300 PRNT↖	3	0364 B	
0238 0	0302 -		0365 E	
0239 ENTER↑	0303 8		0366 R	
0240 6	0304 END↖		0367	
0241 ENTER↑	0305 0		0368 0	
0242 1	0306 ENTER↑		0369 F	
0243 0	0307 6		0370	
0244 CSPC	0308 ENTER↑		0371 P	
0246 0	0309 8		0372 A	

0373	T			0441	ENDα			0512	3	
0374	I			0442	6			0513	.	
0375	E			0443	.			0514	9	
0376	N			0444	3			0515	RCL	A
0377	T			0445	RCL	A		0516	MOVE	3
0378	S			0446	MOVE	3		0518	PRNTα	3
0379	:			0448	PRNTα	3		0520	I	
0380	ENDα			0450	G			0521	ENDα	
0381	RCL	J		0451	ENDα			0522	3	
0382	PRNTα	3		0452	6			0523	.	
0384	PRINT			0453	.			0524	6	
0385	ENDα			0454	0			0525	RCL	A
0386	7			0455	RCL	A		0526	MOVE	3
0387	.			0456	MOVE	3		0528	PRNTα	3
0388	8			0458	PRNTα	3		0530	T	
0389	ENTER↑			0460	E			0531	ENDα	
0390	1			0461	ENDα			0532	3	
0391	.			0462	5			0533	.	
0392	2			0463	.			0534	3	
0393	8			0464	4			0535	RCL	A
0394	+←-			0465	RCL	A		0536	MOVE	3
0395	STO	A		0466	MOVE	3		0538	PRNTα	3
0396	MOVE	3		0468	PRNTα	3		0540	Y	
0398	PRNTα	3		0470	A			0541	ENDα	
0400	A			0471	ENDα			0542	2	
0401	ENDα			0472	5			0543	.	
0402	7			0473	.			0544	7	
0403	.			0474	1			0545	ENTER↑	
0404	5			0475	RCL	A		0546	1	
0405	RCL	A		0476	MOVE	3		0547	.	
0406	MOVE	3		0478	PRNTα	3		0548	3	
0408	PRNTα	3		0480	F			0549	0	
0410	V			0481	ENDα			0550	+←-	
0411	ENDα			0482	4			0551	MOVE	3
0412	7			0483	.			0553	PRNTα	3
0413	.			0484	8			0555	(	
0414	2			0485	RCL	A		0556	K	
0415	RCL	A		0486	MOVE	3		0557	)	
0416	MOVE	3		0488	PRNTα	3		0558	ENDα	
0418	PRNTα	3		0490	F			0559	0	
0420	E			0491	ENDα			0560	ENTER↑	
0421	ENDα			0492	4			0561	0	
0422	6			0493	.			0562	ENTER↑	
0423	.			0494	5			0563	1	
0424	9			0495	RCL	A		0564	1	
0425	RCL	A		0496	MOVE	3		0565	1	
0426	MOVE	3		0498	PRNTα	3		0566	CHAR	3
0428	PRNTα	3		0500	I			0568	7	
0430	R			0501	ENDα			0569	WBYTE	3
0431	ENDα			0502	4			0571	PRNTα	
0432	6			0503	.			0573	W	
0433	.			0504	2			0574	E	
0434	6			0505	RCL	A		0575	R	
0435	RCL	A		0506	MOVE	3		0576	T	
0436	MOVE	3		0508	PRNTα	3		0577		
0438	PRNTα	3		0510	N			0578	F	
0440	A			0511	ENDα			0579	U	

0580 E		0645 0		0709 X≠Y	
0581 R		0646 0		0710 ÷	
0582		0647 STO	R049	0711 RCL	C
0583 R		0649 PRNTα		0712 RCL I	A
0584		0651 F		0714 *	
0585 N		0652 0		0715 1	
0586 G		0653 R		0716 0	
0587 ?		0654 M		0717 0	
0588 ENDα		0655 E		0718 ÷	
0589 STOP		0656 L		0719 RCL	C
0590 STO	C	0657		0720 X≠Y	
0591 1		0658 1		0721 -	
0592 STO	A	0659		0722 5	
0593 9		0660 0		0723 7	
0594 STO	F	0661 D		0724 3	
0595 5		0662 E		0725 3	
0596 0		0663 R		0726 ÷	
0597 #REGS		0664		0727 EEX	
0598 .		0665 2		0728 6	
0599 0		0666 ENDα		0729 +=-	
0600 4		0667 STOP		0730 *	
0601 STO	R041	0668 1		0731 ÷	
0603 .		0669 IF X=Y		0732 EEX	
0604 1		0670 GOTO	E	0733 8	
0605 4		0672 X≠Y		0734 ÷	
0606 STO	R042	0673 2		0735 RCL	A
0608 .		0674 IF X=Y		0736 4	
0609 2		0675 GOTO	F	0737 0	
0610 4		0677 LBL		0738 +	
0611 STO	R043	---- E		0739 STO	R000
0613 .		0679 1		0741 RCL I	R000
0614 4		0680 STO	A	0743 RCL I	A
0615 4		0681 9		0745 *	
0616 STO	R044	0682 STO	F	0746 1	
0618 2		0683 FOR	A+F	0747 0	
0619 .		0684 RCL	A	0748 0	
0620 0		0685 1		0749 ÷	
0621 4		0686 IF X=Y		0750 RCL	C
0622 STO	R045	0687 GOTO	L01	0751 ÷	
0624 4		0689 2		0752 1	
0625 .		0690 0		0753 0	
0626 0		0691 ENTER↑		0754 0	
0627 4		0692 4		0755 *	
0628 STO	R046	0693 2		0756 LOG	
0630 2		0694 ENTER↑		0757 X≠Y	
0631 0		0695 1		0758 ROLL↓	
0632 .		0696 1		0759 PLOT	3
0633 0		0697 1		0761 NEXT	A
0634 4		0698 CHAR	3	0762 STOP	
0635 STO	R047	0700 LBL		0763 LBL	
0637 4		---- 01		---- F	
0638 0		0702 1		0765 1	
0639 .		0703 0		0766 STO	A
0640 0		0704 0		0767 9	
0641 4		0705 RCL I	A	0768 STO	F
0642 STO	R048	0707 -		0769 FOR	A+F
0644 4		0708 LSTX		0770 RCL	A

0771	1			0836	RCL I	R000	0901	0		
0772	IF X=Y			0838	RCL I	A	0902	+		
0773	GOTO	L02		0840	*		0903	STO	R000	
0775	2			0841	1		0905	RCL I	R000	
0776	0			0842	0		0907	RCL I	A	
0777	ENTER↑			0843	0		0909	*		
0778	4			0844	÷		0910	1		
0779	2			0845	RCL	C	0911	0		
0780	ENTER↑			0846	÷		0912	0		
0781	1			0847	1		0913	÷		
0782	1			0848	0		0914	RCL	C	
0783	1			0849	0		0915	X÷Y		
0784	CHAR	3		0850	*		0916	5		
0786	LBL			0851	LOG		0917	7		
----	02			0852	X÷Y		0918	3		
0788	1			0853	ROLL↓		0919	3		
0789	0			0854	PLOT	3	0920	÷		
0790	0			0855	NEXT	A	0921	EEX		
0791	RCL I	A		0857	STOP		0922	6		
0793	-			0858	0		0923	+÷-		
0794	LSTX			0859	ENTER↑		0924	*		
0795	X÷Y			0860	ENTER↑		0925	X÷Y		
0796	÷			0861	1		0926	ROLL↓		
0797	RCL	A		0862	2		0927	÷		
0798	1			0863	0		0928	EEX		
0799	0			0864	CHAR	3	0929	8		
0800	+			0866	1		0930	÷		
0801	STO	R000		0867	1		0931	RCL	A	
0803	RCL I	R000		0868	STO	A	0932	3		
0805	RCL I	A		0869	1		0933	0		
0807	*			0870	9		0934	+		
0808	1			0871	STO	F	0935	STO	R000	
0809	0			0872	FOR	A÷F	0937	RCL I	R000	
0810	0			0873	1		0939	RCL I	A	
0811	÷			0874	IF X=Y		0941	*		
0812	RCL	C		0875	GOTO	L03	0942	1		
0813	X÷Y			0877	2		0943	0		
0814	-			0878	0		0944	0		
0815	5			0879	ENTER↑		0945	÷		
0816	7			0880	4		0946	RCL	C	
0817	3			0881	6		0947	÷		
0818	3			0882	ENTER↑		0948	1		
0819	÷			0883	1		0949	0		
0820	EEX			0884	2		0950	0		
0821	6			0885	0		0951	*		
0822	+÷-			0886	CHAR	3	0952	LOG		
0823	*			0888	LBL		0953	X÷Y		
0824	X÷Y			----	03		0954	ROLL↓		
0825	ROLL↓			0890	1		0955	PLOT	3	A
0826	÷			0891	0		0957	NEXT		
0827	EEX			0892	0		0958	STOP		
0828	8			0893	RCL I	A	0959	END		
0829	÷			0895	-					
0830	RCL	A		0896	LSTX					
0831	4			0897	X÷Y					
0832	0			0898	÷					
0833	+			0899	RCL	A				
0834	STO	R000		0900	3					

ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Schon gut 20 Jahre ist bekannt, daß ein Teil der Typ II-Diabetiker mit Sekundärversagen einer Sulfonylharnstofftherapie nach Umstellung auf Insulin zunehmend höhere Insulindosen zur Stoffwechselkompensation benötigten.

Außerdem gaben immer mehr Arbeiten Anlaß, einen beta-zytotropen Effekt orale Antidiabetika als alleinigen Wirkmechanismus in Frage zu stellen und stattdessen nach extrapankreatischen Wirkmechanismen dieser Stoffe zu suchen.

Eine erste plausible Erklärung für diese Beobachtungen lieferten neuere Arbeiten, die

- 1) Insulinrezeptoren an vielen Erfolgsorganen, unter anderem auch an Erythrozyten nachweisen konnten, deren Besetzung Voraussetzung für eine Insulinwirkung ist.
- 2) beweisen konnten, daß nach Gabe von hohen Insulindosen die Zahl der Insulinrezeptoren abnimmt.

Die Ergebnisse all dieser Arbeiten legen den Schluß nahe, daß bei Sekundärversagen einer Sulfonylharnstofftherapie bei Typ II-Diabetikern anstelle der bislang empfohlenen Umstellung auf eine alleinige Insulintherapie eine Kombinationstherapie zu einer besseren Stoffwechseleinstellung mit weniger Insulin führen müßte.

Diese Kombinationstherapie (Insulin + Glibenclamid bei Glibenclamid-Sekundärversager) - Gruppe B - wurde in der vorliegenden Arbeit gegen die übliche Insulinmonotherapie - Gruppe A - in einer kontrollierten klinischen Studie geprüft.

Außerdem wurde der Einfluß der Sulfonylharnstoffe bei Typ II-Diabetikern untersucht, die bereits eine relative Insulinresistenz entwickelt hatte - Gruppe C -.

Neben den klinischen Parametern Glucose-, C-Peptid- und Insulinkonzentration im Plasma sowie der 24 h-Harnzuckerausscheidung sollte zum ersten Mal im direkten Vergleich die Änderung der Insulinbindung an den dafür spezifischen Rezeptoren unter den verschiedenen Therapien gemessen und die Ursache dafür (Änderung der Rezeptorenzahl und/oder der Rezeptoraffinität) ermittelt werden.

Ergebnisse:

Zwei statistisch gleiche Kollektive, die sich aus Typ II-Diabetikern mit Sekundärversagen ihrer Sulfonylharnstofftherapie zusammensetzten, wurden untersucht, als sie das Krankenhaus zur Umstellung auf Insulin aufsuchten.

Unter der **Monotherapie** mit relativ hohen Insulindosen (33,6 E/Tag) nahm innerhalb von knapp 6 Tagen die **Höhe der spezifischen Bindung** signifikant von 8,79 % auf 7,59 % ab. Es bestand dabei eine signifikante Korrelation zwischen der Zahl der zugeführten Insulineinheiten und der Höhe der spezifischen Bindung. Ursache der Bindungsabnahme war, daß die **Zahl der Rezeptoren** von 33 auf 24 pro Erythrozyt zurückging. Die **Affinität** ($5,1 \times 10^{+8} \text{M}^{-1}$ bzw. $1,5 \times 10^{+8} \text{M}^{-1}$ im unbesetzten bzw. besetzten Zustand) änderte sich unter der Monotherapie nicht.

Die **Kombinationstherapie** erzielte mit nur 12,2 E Insulin neben 3 Tabletten Euglucon 5 pro Tag eine statistisch gleiche Stoffwechselverbesserung. Dabei stieg unter der Therapie die **spezifische Bindung** vom 8,55 % auf 9,25 % signifikant an. Ursache dafür war eine Zunahme der **Insulinrezeptoren** von 33 auf 34 pro Erythrozyt. Die **Affinität der Rezeptoren** ($4,8 \times 10^{+8} \text{M}^{-1}$ bzw. $1,5 \times 10^{+8} \text{M}^{-1}$) wurde von der Kombinationstherapie nicht beeinflusst.

Der positive Einfluß einer Insulin - Glibenclamid-Kombinationstherapie auf die Insulinrezeptoren trat bei der **Gruppe C**, die trotz einer täglichen Insulindosis von durchschnittlich 92,2 E pathologisch hohe Blut- und Harnzuckerwerte aufwies, besonders eindrucksvoll

hervor: Unter der Kombinationstherapie ging bei dieser Gruppe der **tägliche Insulinbedarf** um mehr als die Hälfte von 92,2 E auf 44,6 E zurück. Trotz dieser enormen Insulinreduktion verbesserte sich unter der Therapie die tägliche Harnzuckerausscheidung und die Serumglucosekonzentration auf Werte, die denen der beiden anderen Gruppen glichen.

Außerdem nahm bei dieser **Gruppe C** die **C-Peptid-Konzentration** und damit die endogene Insulinproduktion von 0,67 µg/µl auf 1 µg/µl signifikant zu.

Die weitgehende Normalisierung des Stoffwechsels läßt sich nicht mit der Zunahme der **Plasmainsulinspiegel** erklären:

Diese nahmen im Gegenteil unter der Kombinationstherapie auf fast die Hälfte ab. Die verbesserte Insulinwirkung kann demnach nur mit einer Änderung an den Rezeptoren (bzw. an den sich daran anschließenden Prozessen) erklärt werden.

Diese Änderung auf Rezeptorebene ließ sich nachweisen: Unter der Therapie stieg die **spezifische Bindung** signifikant von subnormalen 5,56 % auf 9,71 %, so daß sie sich statistisch nicht mehr von der Gruppe B bzw. von der der Normalgruppe unterschied.

Diese Erhöhung der spezifischen Bindung wurde durch eine 60 %ige **Zunahme der Rezeptorzahl** von 21 auf 33 bewirkt.

Die **Affinität** hingegen war mit $5,0 \times 10^{+8} \text{ M}^{-1}$ bzw. $2,0 \times 10^{+8} \text{ M}^{-1}$ schon vor Beginn der Kombinationstherapie mit der der anderen Gruppen vergleichbar und nahm unter der Therapie nur unwesentlich zu.

Zwischen der Zunahme der spezifischen Bindung und der Abnahme des täglichen Insulinbedarfs konnte eine Korrelation nachgewiesen werden. Dies bedeutet aber, daß die Zahl der täglich benötigten bzw. verabreichten Insulinheiten einen entscheidenden Einfluß auf die Höhe der spezifischen Bindung bzw. auf die Zahl der Insulinrezeptoren ausübt.

Aus der vorliegenden Arbeit läßt sich also die **Therapieempfehlung** ableiten, daß bei Typ II-Diabetikern mit Sekundärversagen so wenig Insulin als möglich substituiert werden sollte, um die Zahl der Insulinrezeptoren und damit die Wirksamkeit des endo- und exogenen Insulins zu erhalten. Diese Therapieform scheint den pathologischen Aspekten des Typ II-Diabetes mit peripherer Insulinresistenz und Hyperinsulinämie weit mehr gerecht zu werden als eine alleinige Insulintherapie.

LITERATUR

- 1) Creutzfeld, W.
Fenter, H. Blutzucker und histologische Veränderungen nach D-860 bei normalen Kaninchen
Dtsch. Med. Wochenschr. 81 (1956)
892-896

- 2) Pfeiffer, E.F.
Pfeiffer, M.
Ditschuneit, H.
Ahn, C. Clinical and experimental studies of insulin secretion following tolbutamide and metahexamide administration.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 82 (1959)
479-495

- 3) Yalow, R.S.
Block, H.
Villazon, M.
Berson, S.A. Comparison of plasma insulin levels following administration of tolbutamide and glucose
Diabetes 9 (1960) 356-362

- 4) Loubatieres, A.L. Complementary arguments in favour of the betacytotropic action of the hypoglycemic sulfonamides.
In: Early Diabetes, Camerini-Davalos, R.A. and Cole, H.S. Eds. New York, Academic Press (1970) 411-420

- 5) Hellmann, B.
Täljedal, I-B. Effects of sulfonylurea derivatives on pancreatic beta cells
In: Insulin Pt. 2., Dorzbach, Springer Verlag, Berlin (1975)
175-194

- 6) Grodsky, G.M.
Epstein, G.H.
Fanska, R.
Karam, J.H. Pankreatic action of sulfonylureas
Fed. Proc. 36 (1977) 2714-2719

- 7) Sodoyez, J-C.
Sodoyez-Goffauz, F.
Foa, P.P. Reduction in the activity of the pancreatic islets induced in normal rodents by prolonged treatment with derivatives of sulfonylurea
Diabetes 19 (1979) 603-609.

- 8) Dunbar, J.C.
Foa, P.P. An inhibitory effect of tolbutamide and glibenclamide on the pancreatic islets of normal animals
Diabetologia 10 (1975) 27-35

- 9) Schauder, P.
Frerich, H. Tolbutamide-induced changes of DNA, proteins and insulin content and the secretory activity of isolated rat pancreatic islets.
Diabetologia 11 (1975) 301-305

- 10) Schauder, P.
Arends, J.
Frerich, H. Onset and reversibility of changes
in secretory function and composition
of isolated rat pancreatic islets
following long-term administration of
high or low tolbutamide doses
Metabolism 26 (1978) 189-98

- 11) Lebovitz, H.E.
Feinglos, M.N. Sulfonylurea Drugs: Mechanism of
antidiabetic action and therapeutic
usefulness
Diabetes Care 1 (1978) 189-98

- 12) Tanese, T.
Lazarus, N.R.
Devrim, S.
Recant, L. Synthesis and release of proinsulin
and insulin by isolated rat islets of
Langerhans
J. Clin. Invest. 49 (1970) 1394-1404

- 13) Schatz, H.
Nierle, C.
Pfeiffer, E.F. (Pro-)insulin biosynthesis and release
of newly synthesized (pro-)insulin
from isolated islets of rat pancreas
in the presence of amino acids and
sulfonylureas.
Eur. J. Clin. Invest. 5 (1975) 477-485

- 14) Levy, J.
Malaisse, W.J. The stimulus-secretion coupling of
glucose induced insulin release.
Effects of sulfonylureas and
diazoxide on insular biosynthetic
activity.
Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 235-239

- 15) Duron Garcia, S.
Jarrousse, C.
Rosselin, G. Biosynthesis of proinsulin in newborn
rat pancreas
J. Clin. Invest. 57 (1976) 230-243

- 16) Pek, S.
Fayans, S.S.
Floyd Jr., J.C.
Knopf, R.F.
Conn, J.W. Failure of sulfonylureas to suppress
plasma glucagon in man.
Diabetes 21 (1972) 216-223

- 17) Marco, J.
Valverde, I. Unaltered glucagon secretion after
seven days of sulfonylurea
administration in normal subjects.
Diabetologia 9 (Suppl) (1973) 317-319

- 18) Kalk, W.J.
Vinik, A.I.
Paul, M.
Leller, P.
Jackson, W.P. Immunoreactive glucagon responses
to intravenous tolbutamide in chronic
pancreatitis
Diabetes 24 (1975) 851-855

- 19) Feldmann, J.M.
Lebovitz, H.E. Endocrine and metabolic effects of
glibenclamide: Evidence for an
extrapancreatic mechanism of action
Diabetes 20 (1971) 745-755

- 20) Duckworth, W.C.
Solomon, S.S.
Kitabchi, A.E. Effects of chronic sulfonylurea
therapy on plasma insulin and
proinsulin levels
J. Clin. Endocrinol. 35 (1972) 585-591

- 21) Levey, G.S. The effects of sulfonylureas on
peripheral metabolic processes
Fed. Proc. 36 (1977) 2720-2723

- 22) Lebovitz, H.E.
Feinglos, M.N.
Bucholtz, H.K.
Lebovitz, F.L. Potentiation of insulin action:
A probable mechanism for the
antidiabetic action of sulfonylurea
drugs
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45
(1977) 601-604

- 23) Franckson, J.R.M. Mesure d' l' activité de l' insuline
chez l'homme. Analyse de l'épreuve
d'hypoglycémie
Ann. Soc. Royale Sc. Med. et Nature
de Bruxelles 11 (1958) 5-176

- 24) Franckson, J.R.M.
Malaise, W.
Amould, E.
Ooms, H.A.
Balasse, E.
Canard, V.
Bastenie, P.A. Glucose kinetics in human obesity
Diabetologia 2 (1966) 96-103

- 25) Fabrykant, M. Favourable effects of supplemental
Orinase in Insulin-treated labile
Diabetes
Metabolism. 6 (1957) 509-517

- 26) Fabrykant, M. Use of Orinase as a basic adjuvant
in management of Insulin-dependent
Diabetes
Metabolism. 7 (1958) 213-221

- 27) Fabrykant, M.
Ashe, B.I. Combined Insulin-Tolbutamide
therapy in the management of insulin
dependent diabetes.
Ann. J. Acad. Sci. 82 (1959) 585-589

- 28) Linke, A. Über die Verstärkung der Wirkung
von Insulin durch Tolbutamid
Dtsch. med. Wschr. 47 (1960)
2069-2073

- 29) Stratmann, F.W. Die kombinierte Behandlung des Diabetes mit Insulin und Sulfonylharnstoffen, I: Diabetes mellitus
Hrsg.: A. Beringer u. E. Deutsch, Vorstellung der Wiener Med. Akademie (1970) 109-115
- 30) Knick, B. Orale antidiabetische Mono- und Wendt, O. Kombinationstherapie mit Glibenclamide und Biguaniden bei insulin- Konder, M.L. nierten Diabetikern des Erwachsenen- Netter, P. typs.
Med. Klinik 65 (1970) 109
- 31) Bachmann, W. Insulin plus Sulfonylharnstoffe - eine (un-)mögliche Kombination?
Dtsch. Med. Wschr. 107 (1982) 163-165
- 32) Hamelbeck, H. Glibenclamid-Insulin Kombinations- Klein, W. behandlung beim Sekundärversagen Zoltobrocki, M. der Sulfonylharnstoff-Therapie Schöffling, K. Dtsch. Med. Wschr. 107 (1982) 1581-1583
- 33) Olefsky, J.M. Decreased insulin binding to Reaven, G.M. lymphocytes from diabetic patients
J. Clin. Invest. 54 (1974) 1323-1328
- 34) Olefsky, J.M. Insulin binding to monocytes and Reaven, G.M. total mononuclear leukocytes from normal and diabetic patients
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43 (1976) 232-234
- 35) Olefsky, J.M. Effects of sulfonylurea therapy on Reaven, G.M. Insulin binding to mononuclear leukocytes of diabetic patients.
Am. J. Med. 60 (1976) 89-95
- 36) Holle, A. Biguanide treatment increases the Mangels, W. number of insulin-receptor sites on Dreier, M. human erythrocytes Kühnau, J. New Engl. J. Med. 305 (1981) 536-566 Rüdiger, H.W.
- 37) Reaven, G.M. Nonketotic Diabetes Mellitus: Bernstein, R. Insulin Deficiency or Insulin Davies, B. Resistance? Olefsky, G.M. Am. J. Med. 60 (1976) 80-88
- 38) Beck-Nielsen, H. Increased insulin sensitivity and Pedersen, O. cellular Insulin binding in obese Lindskov, H.-O. diabetics following treatment with Glibenclamid
Acta Endocr. 90 (1979) 451-462

- 39) Gorden, P.
Carpentier, J.-L.
Freychat, P.
LeCom, A.
Orci, L.
Intracellular translocation of iodine-125-labeled insulin: Direct demonstration in isolated hepatocytes. *Science* 200 (1978) 782-785
- 40) Carpentier, J.-L.
Gorden, P.
Freychat, P.
LeCom, P.
Orci, L.
Lysosomal association of internalized 125-J-Insulin in isolated rat hepatocytes. Direct demonstration by quantitative electron microscopic autoradiography *J. Clin. Invest.* 63 (1979) 1249-1261
- 41) Bergeron, J.M.
Sikstrom, R.
Hand, A.R.
Posner, B.I.
Binding and uptake of 125-J- Insulin into rat liver hepatocytes and endothelium. An in vivo radioautographic study. *J. Cell. Biol.* 80 (1979) 427-443
- 42) Schlessinger, J.
Schechter, Y.
Willingham, M.S.
Pastan, I.
Direct visualization of binding, aggregation and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2659-2663
- 43) Gorden, P.
Carpentier, J.-L.
Freychat, P.
Orci, L.
Internalization of Polypeptide Hormones *Diabetologia* 18 (1980) 263-274
- 44) Kahn, R.C.
Membrane receptors for hormones and neurotransmitters *J. Cell. Biol.* 70 (1976) 261-286
- 45) Cuatrecasas, P.
Membrane receptors *A. Rev. Biochem.* 43 (1974) 169-214
- 46) Kono, T.
Barham, F.W.
The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 6210-6216
- 47) Freychet, P.
Roth, J.
Neville Jr., D.M.
Insulin receptors in the liver: Specific binding of (125J) insulin to the plasma membrane and its relocation to bioactivity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1833-37
- 48) Gliemann, J.
Gammeltoft, S.
The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells. *Diabetologia* 10 (1974) 105-113

- 50) Yalow, R.S.
Berson, S.A. Immunoassay of endogenous plasma
insulin in man
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157-75
- 51) Roth, J. Insulin Binding to its Receptor:
Is the Receptor more important than
the hormone?
Diabetes Care 4 (1981) 27-32
- 52) Gavin III, J.R.
Roth, J.
Neville Jr., D.M.
De Meyts, P.
Buell, D.N. Insulin-dependent regulation of
insulin receptor concentration:
a direct demonstration in cell culture
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974)
84-88
- 53) Bar, R.S.
Gorden, P.
Roth, J.
Kahn, C.R. Fluctuations in the affinity and concen-
tration of the insulin receptors on
circulating monocytes of obese
patients: effects of starvation, refee-
ding and dieting
J. Clin. Invest. 58 (1976) 1123-1135
- 54) Beck-Nielsen, H.
Pedersen, O.
Bagger, J.P.
Soerensen, N.S. The insulin receptor in normal
and obese patients
Acta Endocrinol (Copenh.) 83
(1976) 565-576
- 55) Olefsky, J.M.
Reaven, G.M. Insulin binding in diabetes:
Relationship with plasma insulin
levels and insulin sensitivity
Diabetes 26 (1977) 680-689
- 56) Pezzino, V.
Vigneri, R.
Pliam, N.B.
Goldfine, I.D. Rapid regulation of Plasma membrane
Insulin receptors
Diabetologia 19 (1980) 211-215
- 57) Eaton, R.P.
Galagan, R.
Kaufmann, E.
Allen, R.C.
Russel, L.
Miller, F. Receptor depletion in diabetes
mellitus: Correction with therapy
Diabetes Care 4 (1981) 299-304
- 58) Trautmann, K.J.
Hösl, W.
Grom, E.
Wittemann, G. Kombination von Insulin und
Sulfonylharnstoffen bei der Therapie
des Diabetes mellitus vom Erwachsen-
en-Typ
Dtsch. med. Wschr. 107 (1982) 180-84
- 59) Knick, B.
Fockert, F. Zur klinischen Einstellbarkeit der
verschiedenen Diabetesformen
Münch. Med. Wschr. 2 (1965) 83-88

- 60) Mehnert, H. Aktuelle Probleme der Diabetes-
therapie
Ärztliche Fortbildung 9 (1969) 449-451
- 61) Mehnert, H. Zwanzig Jahre orale Diabetestherapie
Dietze, G. Münch. Med. Wschr. 117 (1975)
Haslbeck, M. 1221-1228
- 62) Archer J.A. Defect in insulin binding to receptors
Gorden, P. in obese man: amelioration with
Roth J. caloric restriction.
J. Clin. Invest. 55 (1975) 166-174
- 63) Baxter, D. The control of insulin receptors in
Lazarus, N.R. the New Zealand obese mouse
Diabetologia 11 (1975) 261-267
- 64) Soll, A.H. Insulin receptor deficiency in gene-
Kahn, R.C. tic and acquired obesity
Neville Jr., D.M. J. Clin. Invest. 56 (1975) 769-780
- 65) Olefsky, J.M. Decreased insulin binding to
adipocytes and circulating monocytes
from obese subjects
J. Clin. Invest. 57 (1957) 1165-72
- 66) Olefsky, J.M. The insulin receptor: Its role in
insulin resistance of obesity and dia-
betes.
Diabetes 25 (1976) 1154-1162
- 67) Beck-Nielsen, H. The pathogenetic role of an insulin-
receptor defect in diabetes mellitus of
the obese
Diabetes 27 (1978) 1175-1181
- 68) Gambhir, K.K. Insulin Radioreceptor assay for
Archer, J.A. human erythrocytes
Carter, L. Clin. Chem. 23 (1977) 1590-1595
- 69) Gambhir, K.K. Characteristics of human erythro-
Archer, J.A. cyte insulin receptors
Bradley, C.J. Diabetes 27 (1978) 701-708
- 70) Robinson, T.J. Erythrocytes: A new cell type for
Archer, J.A. the evaluation of insulin receptor
Gambhir, K.K. defects in diabetic humans
Hollis Jr., V.W. Science 205 (1979) 200-202
Carter, L.
Bradley, C.

- 71) Bachmann, W.
Sieger, C.
Lacher, F.
Lotz, N.
Binding of biosynthetic human insulin to erythrocytes of normal and Insulin-dependent diabetic subjects: Comparison with pork and human pancreatic insulin
Diabetes Care 4 (1981) 215-219.
- 72) Levine, R.
Goldstein, M.S.
On the mechanism of action of insulin
Recent Prog. Horm. Res. 11 (1955) 343-80
- 73) Pastan, I.
Roth
Macchia, V.
Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56 (1966) 1802-1809
- 74) Cuatrecasas, P.
Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 450-457
- 75) Kolb, H.J.
Renner, R.
Hepp, K.D.
Weiss, L.
Wieland, O.H.
Re-evaluation of Sepharose-Insulin as a tool for the study of Insulin action (biological activity/stability
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 248-252
- 76) Katzen, H.M.
Vlahakes, G.J.
Biological Activity of Insulin Sepharose?
Science 179 (1973) 1142-1143
- 77) Butcher, R.W.
Crofford, O.B.
Gammeltoft, S.
Gliemann, J.
Gavin III, J.R.
Goldfine, I.D.
Kahn, C.R.
Rodbell, M.
Roth, J.
Insulin activity: The solid Matrix
Science 182 (1973) 396-397
- 78) Lefkowitz, R.J.
Roth, J.
Pastan, I.
Radioreceptor assay for adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma
Science 170 (1970) 633-635
- 79) Lefkowitz R.J.
Roth, J.
Pricer, W.
Pastan, I.
ACTH-receptors in the adrenal: specific binding of ACTH - 125 J and its relations to adenyl cyclase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65 (1970) 745-52

- 80) Lin, W-Y.
Goodfriend, T.L. Angiotensin receptors
Am. J. Phys. 218 (1970) 1319-28
- 81) Kahn, C.R. Membrane receptors for polypeptide
hormones. Methods in Membrane
Biology.
In. E.D. Korn (Herausgeber) Band 3
Plenum Press, New York (1975) 81-146
- 82) Levey, G.S.
Fletcher, M.A.
Klein, I.
Ruiz, E.
Schenk, A. Characterization of 125 J-glucagon
binding in a solubilized preparation
of cat myocardial adenylat cyclase
J. Biol. Chem. 249 (1974) 2668-2673
- 83) Gliemann, J. Release of insulin-degrading
activity from intact adipocytes.
A possible role in regulation of
interstitial insulin concentrations
Diabetologia 12 (1976) 393
- 84) Cuatrecasas, P.
Hollenberg, M.D. Binding of insulin and other
hormones to nonreceptor materials:
Saturability, specificity and apparent
"negative cooperativity".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62
(1975) 31-41
- 85) Freychet, P.
Roth, J.
Neville Jr., D.M. Monoiodoinsulin: Demonstration of its
biological activity and binding to fat
cells and liver membranes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43
(1971) 400-408
- 86) Freychet, P. The interactions of proinsulin with
insulin receptors on the plasma
membranes of the liver
J. Clin. Invest. 54 (1974) 1020-1031
- 87) Freychet, P.
Kahn, R.
Roth, J.
Neville Jr., D.M. Insulin interactions with liver
plasma membranes
Independence of binding of the
hormone and its degradation
J. Biol. Chem. 247 (1972)
3953-3961
- 88) Freychet, P.
Brandenburg, D.
Wollmer, A. Receptor-binding assay of chemically
modified insulins. Comparison with in
vitro and in vivo bioassays.
Diabetologia 10 (1974) 1-5

- 89) Simon, J.
Freychet, P.
Rosselin, G.
Chicken insulin: Radioimmunological characterization and enhanced activity in rat fat cells and liver plasma membranes
Endocrinology 95 (1974) 1439-1449
- 90) Forgue, M.W.
Freychet, P.
Insulin receptors in the heart muscle: Demonstration of specific binding sites and impairment of insulin binding in the plasma membrane of the obese hyperglycemic mouse.
Diabetes 24 (1975) 715-723
- 91) Cuatrecasas, P.
Insulin receptor interactions in adipose tissue cells: Direct measurement and properties
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 68 (1971) 1264-1268
- 92) Goldfine, I.D.
Gardner, J.D.
Neville, D.M.
Insulin action in isolated rat thymocytes. Binding of 125-I-insulin and stimulation of an aminoisobutyric acid transport.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 6919-6926
- 93) Rosselin, G.
Freychet, P.
Fouchereau, M.
Rancon, F.
Broer, Y
Interactions of insulin and glucagon with isolated rat liver cells. Dynamic changes in the cyclic AMP induced by hormones
Horm. Metab. Res. Suppl. Series 5 (1974) 78-86
- 94) Gliemann, J.
Gammeltoft, S.
Vinten, J.
Time course of insulin receptor binding and insulin induced lipogenesis in isolated rat fat cells
J. Biol. Chem. 250 (1975) 3368-3374
- 95) Freychet, P.
Interactions of polypeptide Hormons with cell membrane specific receptors: Studies with Insulin and Glucagon
Diabetologia 12 (1976) 83-100
- 96) Freychet, P.
Recepteurs de l'insuline.
Diabète et Métabolisme (Paris) 1 (1975) 57-68

- 97) Roth, J.
Kahn, C.R.
Lesniak, M.A.
Gorden, P.
De Meyts, P.
Megyesi, K.
Neville Jr., D. M.
Gavin III, J.R.
Soll, A.H.
Freychet, P.
Goldfine, I.D.
Bar, R.S.
Archer, J.A.
Receptors for insulin, NSILA-s,
and growth hormone: Applications to
disease states in man.
Recent Progr. Hormone Res. 31
(1975) 95-139
- 98) Kahn, C.R.
Neville Jr., D.M.
Gorden, P.
Freychet, P.
Roth, J.
Insulin receptor defect in insulin
resistance: Studies in the obese
hyperglycemic mouse.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48
(1972) 135-142
- 99) Freychet, P.
Laudat, M.H.
Laudat, P.
Rosselin, G.
Kahn, C.R.
Gorden, P.
Roth, J.
Impairment of Insulin binding to
the fat cell plasma membrane in the
obese hyperglycemic mouse
FEBS-Letters 25 (1972) 339-342
- 100) Soll, A.H.
Goldfine, I.D.
Roth, J.
Kahn, C.R.
Neville Jr., D.M.
Thymic lymphocytes in obese (ob/ob)
mice: A mirror of the insulin
receptor defect in liver and fat.
J. Biol. Chem. 249 (1974)
4127-4131
- 101) Kahn, C.R.
Neville Jr., D.M.
Roth, J.
Insulin receptor interaction in
the obese hyperglycemic mouse:
A model of insulin resistance
J. Biol. Chem. 248 (1973)
244-250
- 102) Soll, A.H.
Kahn, C.R.
Neville Jr., D.M.
Insulin binding to liver plasma
membranes in the obese hyperglycemic
(ob/ob) mouse. Demonstration of a
decreased number of functionally
normal receptors.
J. Biol. Chem. 250 (1975) 4702-07
- 103) Olefsky, J.M.
The effects of spontaneous obesity
on insulin binding, glucose transport
and glucose oxidation of isolated rat
adipocytes
J. Clin. Invest. 57 (1976) 842-851

- 104) Olefsky, J.
Bacon, V.C.
Baur, S. Insulin receptors of skeletal muscle:
specific insulin binding sites and
demonstration of decreased numbers of
sites in obese rats.
Metabolism 25 (1976) 179-91
- 105) Freeman, C.
Karoly, K.
Adelmann, R.C. Impairments in availability of insulin
to liver in vivo and in binding of
insulin to purified hepatic plasma
membrane during aging
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54
(1973) 1573-80
- 106) Goldfine, I.D.
Kahn, C.R.
Neville Jr., D.M.
Roth, J.
Garrison, M.M.
Bates, R.W. Decreased binding of insulin to its
receptors in rats with hormone
induced insulin resistance
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53
(1973) 852-857
- 107) Olefsky, J.M.
Johnson, J.
Liu, F.
Jen, P.
Reaven, G.M. The effect of acute and chronic
dexamethason administration on
insulin binding to isolated rat
hepatocytes and adipocytes
Metabolism 24 (1975) 517-527
- 108) Hepp, K.D.
Longley, J.
Von Funke, H.J.
Renner, R.
Kemmler, W. Increased insulin binding capacity
of liver membranes from diabetic
Chinese hamsters
Nature 258 (1975) 154
- 109) Davidson, M.B.
Kaplan, S.A. Effect of insulin therapy on caloric
restriction in the increased insulin
binding by hepatic plasma membranes
from diabetic rats (Abstract)
Diabetes 24 (suppl.2) (1975) 394
- 110) Olefsky, J.M.
Crapo, P.A.
Ginsberg, H.
Reaven, G.M. Metabolic effects of increased
caloric intake in man
Metabolism 24 (1975) 495-503
- 111) Archer, J.A.
Gordon, P.
Gavin II. J.R.
Lesniak, M.
Roth, J. Insulin receptors in human circu-
lating lymphocytes: application to the
study of insulin resistance in
man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36
(1973) 627-633
- 112) Olefsky, J.M.
Reaven, G.M. Decreased insulin binding to
lymphocytes from diabetic patients
J. Clin. Invest. 54 (1974)
1323-1328

- 113) Pedersen, O.
Beck-Nielsen, H.
Heding, L.
Increased insulin receptors after exercise in patients with insulin-dependent diabetes mellitus
New Engl. J. Med. 302 (1980) 886-892
- 114) Flier, J.S.
Kahn, C.R.
Roth, J.
Bar, R.S.
Antibodies that impair insulin receptors binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance.
Science 190 (1975) 63-65
- 115) Kahn, C.R.
Flier, J.S.
Bar, R.S.
Archer, J.A.
Gordon, P.
Martin, M.M.
Roth, J.
The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man.
New Engl. J. Med. 294 (1976) 739-45
- 116) Bar, R.S.
Muggeo, M.
Kahn, C.R.
Gordon, P.
Roth, J.
Characterization of the insulin receptors in patients with the syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans
Diabetologia 18 (1980) 209-16
- 117) Kobayashi, M.
Olefsky, J.M.
Elders, J.
Mako, M.E.
Given, B.O.
Schedwie, H.K.
Fiser, R.H.
Hintz, R.L.
Horner, J.A.
Rubenstein, A.H.
Insulin resistance due to a defect distal to the insulin receptor: demonstration in a patient with leprechaunism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3469-73
- 118) Schilling, E.E.
Rechler, M.M.
Grunfeld, C.
Rosenberg, A.
Primary defect of insulin receptors in skin fibroblasts cultured from an infant with leprechaunism and insulin resistance
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 5877-81
- 119) Taylor, S.I.
Podskalny, J.M.
Samuels, B.
Roth, J.
Brasel, D.E.
Pokora, T.
Engel, R.R.
Leprechaunism: a congenital defect in the insulin receptor.
Clin. Res. (1980) 408 A

- 120) Wachslight-
Rodbard, H.
Gross, H.A.
Rodbard, D.
Ebert, M.H.
Roth, J.
Increased Insulin binding to erythrocytes in anorexia nervosa: restoration to normal with refeeding
N. Engl. J. Med. 300 (1979) 882-887
- 121) Oxid, S.
Beck-Nielsen, H.
Pedersen, P.
Sovik, O.
Decreased binding of insulin to its receptor in patients with congenital generalized lipodystrophy
N. Engl. J. Med. 296 (1977) 245-50
- 122) Kobayashi, M.
Meek, J.C.
Increased insulin binding to circulating monocytes'insulin receptors in hyperthyroid patients
Abstracts of the 58th annual meeting of the Endocrine Society (26.06.76) 69
- 123) Kahn, R.C.
Roth, J.
Insulin receptors in disease states
In: Isolation of hormon receptors (ed. Levey, G.S.), New York: Marcel Dekker, Inc. (1976) 1-29
- 124) Bennett, G.V.
Cuatrecasas, P.
Insulin receptor of fat cells in insulin resistant metabolic states
Science 176 (1972) 805-806
- 125) Gavin III, J.R.
Gorden, P.
Roth, J.
Archer, J.A.
Buell, D.N.
Characterristics of the human lymphocyte insulin receptor.
J. Biol. Chem. 248 (1973) 2202-2207
- 126) Misbin, R.I.
Pulkkinen, A.J.
Lofton, S.A.
Merimee, T.J.
Ketoacids and the insulin receptor
Diabetes 27 (1978) 539-42
- 127) Somon, V.R.
Kaivisto, V.A.
Granthom, P.
Felig, P.
Increased insulin binding to monocytes after acute exercise in normal man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47 (1978) 216-219
- 128) Somon, V.R.
Veikko, A.K.
Deibert, D.
Feilig, P.
De Fronzo, R.A.
Increased insulin sensitivity and insulin binding to monocytes after physical training
N. Engl. J. Med. 301 (1979) 1200-1204
- 129) Kahn, C.R.
Goldfine, I.D.
Neville Jr., D.M.
De Meyts, P.
Alteration in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone
Endocrinology 103 (1978) 1054-1056

- 130) Olefsky, J.M.
Seakow, M.
The effects of dietary carbohydrate content on insulin binding and glucose metabolism by isolated rat adipocytes.
Endocrinology 103 (1978) 2252-2263
- 131) Ip, C.
Teppermann, H.M.
Holohan, P.
Insulin binding and insulin response of adipocytes from rats adapted to fat feeding
J. Lipid. Res. 17 (1976) 588-599
- 132) Eng, J.
Lee, L.
Yalow, R.
Influence of the age of erythrocytes on their insulin receptors
Diabetes 29 (1980) 164-166
- 133) Kosmakos, F.C.
Nagulesparan, M.
Bennett, P.H.
Insulin binding to erythrocytes: A negative correlation with red cell age
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51 (1980) 46-50
- 134) Beck-Nielsen, H.
Pedersen, O.
Diurnal variation in insulin binding to human monocytes
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47 (1978) 385-390
- 135) Merimee, T.J.
Pulkkiwew, A.J.
Lofton, S.
Increased insulin binding by lymphocyte receptors induced by β -OH-butyrate
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43 (1976) 1190
- 136) De Pirro, R.
Bertoli, A.
Greco, A.V.
Fusco, A.
Lauro, R.
Differences in erythrocyte insulin receptor between man and woman.
Acta Endocrinol. (Copenh.) (Suppl.) 225 (1979) 310
- 137) Bar, R.S.
Gorden, P.
Roth, J.
Siebert, C.S.
Insulin receptors in patients with insulinomas
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44 (1977) 1210-13
- 138) De Pirro, R.
Fusco, A.
Bertoli, A.
Lauro, R.
Insulin receptors during the menstrual cycle in normal woman.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47 (1978) 1387-89
- 139) Muggeo, M.
Ginsberg, B.H.
Bath, J.
Kahn, C.R.
De Meyts, P.
Neville Jr., D.M.
The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself
Endocrinology 104 (1979) 1393-1402

- 140) Gammeltoft, S.
Gliemann, J.
The binding of insulins from different animal species to rat fat cell receptors
Acta Physiol. Scand. 91 (1974) 7A-8A
- 141) Gliemann, J.
Gammeltoft, S.
The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells
Diabetologia 10 (1974) 105-113
- 142) Muggeeo, M.
Van Obberghen, E.
Kahn, C.R.
Roth, J.
Ginsberg, B.H.
De Meyts, P.
Emdin, S.O.
Falkmer, S.
The insulin receptor and insulin of the Atlantic hagfish: extraordinary conservation of binding specificity and negative cooperativity in the most primitive vertebrate
Diabetes 28 (1979) 175-181
- 143) Schwartz, R.H.
Bianco, A.R.
Handwerger, B.S.
Kahn, C.R.
Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparation of human peripheral blood mononuclear leucocytes preparation: implication for studies of insulin-resistance states in man.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1975) 474-478
- 144) Beck-Nielsen, H.
Pedersen, O.
Krogballe, K.
Soerensen, N.S.
The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man.
Diabetologia 13 (1977) 563-569
- 145) De Pirro, R.
Fusco, A.
Lauro, R.
Testa, I.
Ferreti, F.
De Martinis, C.
Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus
Diabetes 29 (1980) 96-99
- 146) Archer, J.A.
Insulin receptors in erythrocytes. Influence of oral antidiabetic agents presented 1979 at a Diabetes Symposium
In. Upjohn Monography (1981) 8887-97
- 147) Insel, J.R.
Koltermann, O.G.
Saekow, M.
Olefsky, J.M.
Short-term regulation of insulin receptor affinity in man
Diabetes 29 (1980) 132-139

- 148) Mehnert, H.
Lörcher, M.
Loser, M.
v. Preysing B. Brechnungstabellen für die Diabetes-
diät bei Erwachsenen.
Herausgeber: Diabetes Dienst der
Hoechst AG, Frankfurt und
Boehringer Mannheim GmbH (1980)
- 149) Boeyum, A. Separation of leucocytes from blood
and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21
Suppl. 97 (1968) 77-89
- 150) Fotino,
Merson, E.J.
Allen, F.H. Micromethod for rapid separation
of lymphocytes from peripheral blood.
Ann. Clin. Lab. Sci. 1 (1971)
131-133
- 151) Moore, G.E.
Ito, E.
Ulrich, K.
Sandberg, A.A. Culture of human leukemia cells
Cancer 19 (1966) 713-123
- 152) Dons, R.F.
Corashi, L.M.
Gorden, P. The insulin **receptor** is an age-
dependent integral component of the
human erythrocyte membrane
J. Biol. Chem. 256 (1981) 2982-2987
- 153) Bjerrum, J. Metal amine formation in aqueous
solution
Verlag P. Hasse und Sohn,
Copenhagen (1941)
- 154) Netter, H. Theoretische Biochemie
Springer Verlag, Berlin (1959)
- 155) Deranleau, D.A. Theory of the measurement of weak
molecular complexes.
I. General considerations.
J. Am. Chem. Soc. 91 (1969)
4044-4049
- 156) Klotz, I.M. Energetik biochemischer Reaktionen
Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
- 157) Scatchard, G. The attractions of proteins for
small molecules and ions
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660-
672
- 158) Thomson, C.J.
Klotz, I.M. Macromolecule - small molecule
interactions: analytical and
graphical reexamination.
Arch. Biochem. Biophys. 147 (1971)
178-185

- 159) Schild, H.O. A new scale for the measurement of drug antagonism.
Brit. J. Pharmacol. 2 (1947) 189-206
- 160) Lineweaver, H.
Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 658-666
- 161) Scott, R.L. Some comments on the Benesi - Hildebrand equation.
Rec. Trav. Chim. 75 (1956) 787-789
- 162) Baulieu, E.E.
Raynaud, J.P. A proportion graph method for measuring binding systems.
Eur. J. Biochem. 13 (1970) 293-304
- 163) Chang, K.-J.
Jacobs, S.
Cuatrecasas, P. Quantitative aspects of hormone-receptor interactions of high affinity
Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labeled and unlabeled hormones.
Biochim. Biophys. Acta 406 (1975) 294-303
- 164) Akera, T.
Cheng, V.-J.K. A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies.
Biochim. Biophys. Acta 470 (1977) 412-423
- 165) Eisenthal, R.
Cornish-Bowden, A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters
Biochem. J. 139 81974) 715-721
- 166) Cornish-Bowden, A.
Koshland, Jr., D.E. Diagnostic uses of the Hill (Logit and Nernst) plots.
J. Mol. Biol. 95 (1975) 201-207
- 167) Lesniak, M.a.
Roth, J.
Gorden, P.
Gavin III., J.R. Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes.
Nature (New. Biol.) 241 (1973) 20-22

- 168) De Meyts, P.
Roth, J.
Neville Jr., D.M.
Gavin III., J.R.
Lesniak, M.A. Insulin interactions with its
receptors: Experimental evidence
for negative cooperativity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55
(1973) 154-161
- 169) Marinetti, G.V.
Shlatz, L.
Reilly, K. In: Insulin Action (Fritz, I. ed.)
Academic press, New York (1972)
S. 207
- 170) Ellis, D.J.
Ringold, H.J. In: The Sex Steroids Molecular
Mechanisms (McKerns, K.W., ed).
Appleton Century Crofts, New York
(1971) P. 73
- 171) Klotz, I.M.
Hunston, D.L. Properties of graphical
representations of multiple classes of
binding sites
Biochemistry 10 (1971) 3065-3069
- 172) Weder, H.G.
Schildknecht, J.
Lutz, R.A.
Kesselring, P. Determination of binding parameters
from Scatchard Plots
Theoretical and Practical
Considerations
Eur. J. Biochem. 42 (1974) 475-481
- 173) De Meyts, P.
Roth, J. Cooperativity in ligand binding:
A new graphic analysis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66
(1975) 1118-1126
- 174) Immich, H. Medizinische Statistik
Schattauer Verlag, Stuttgart - New
York (1974)
- 175) Mendenhall, W. Introduction to probability and
statistics
4. Edition, Duxbury Press, North
Scituate, Massachusetts, USA (1975)
- 176) Conover, W.J. Practical nonparametric statistics
New York: John Wiley and Sons, Inc.
(1971)
- 177) Gibbons, J.D. Nonparametric statistical Inter-
ference
Mc Graw Hill, New York (1971)
- 178) Novo Industries, Kopenhagen,
Dänemark Product Information
- 179) Simon, H. Tracer-Methoden in der Biologie in:
Hoppe W., Lohmann W., Markl H. und
Ziegler H.: Biophysik
Springer Verlag, Berlin (1977)

- 180) Künzi, H.P.
Tzschach, H.G.
Zehnder, C.A. In: Numerische Methoden der
mathematischen Optimierung
B.G. Teubner Verlag, Stuttgart (1966)
- 181) Monot, C.
Netter, P.
Stalars, M.C.
Martin, J.
Royer, R.J.
Gaucher, A. Difficulties in applying the Scat-
chard model of ligand binding to
proteins. Proposal of new mathema-
tical tools. Applications to silicates
J. Pharm.Sci. 72 (1983) 35-41
- 182) Joergensen, C. Homogenous Mono-J¹²⁵-Insulin
Diabetologia 19 (1980) 544-554
- 183) Bachmann, W.
Lotz, N.
Mehnert, H. Kombinationstherapie Insulin/
Sulfonylharnstoff (KOMB) bei Typ
II Diabetikern mit Sekundärversagen
einer Sulfonylharnstoff-Therapie
Akt. Endokr. 5 (1983) 177
- 184) Daweke, H. Freisetzung endogener Insulinreserven
bei kombinierter Insulin-Sulfonyl-
harnstoff-Therapie von Typ II-Diabe-
tikern
Akt. Endokr. 4 (1983) 177
- 185) Sachse, G.
Mäser, E.
Federlein, K. Kombinationstherapie mit Insulin Sul-
fonylharnstoffen bei Übergewichtigen
mit Sekundärversagen der Sulfonyl-
Harnst.-Therapie mit erhöhtem Insu-
linbedarf
Akt. Endokr. 5 (1984) 117
- 186) Sauer, H. Therapeutisches Vorgehen bei Sulfo-
nyl-Harnstoff-Sekundärversagen.
Dtsch. med. Wschr. 110 (1985) 27-30
- 187) Lacher, F. Problematik des Insulinrezeptors
menschlicher Erythrozyten
Dissertation der med. Fakultät der
Universität München 1984

Alphabetisches Verzeichnis der zitierten Autoren

A

Akera, T. (164)
Archer, J.A. (62), (111), (146)

B

Bachmann, W. (31), (71), 183)
Bar, R.S. (53), (116), (137)
Baulieu, E.E. (162)
Baxter, D. (63)
Beck-Nielsen, H. (38), (54), (67), (134), (144)
Bennet, G.V. (124)
Bergeron, J.J.M. (41)
Bjerrum, J. (153)
Boyum, R.W. (77)

C

Carpentier, J.-L. (40)
Chang, K.-J. (163)
Chonover, W.J. (176)
Cornish-Bowden, A. (166)
Creutzfeld, W. (1)
Cuatrecasas (45), (74), (84), (91)

D

Davidson, M.B. (109),
Daweke, H. (184)
De Meyts, P. (168), (173)
De Pirro, R. (136), (138), (145)
Deranleau, D.A. (155)
Dons, R.F. (152)
Duckworth, J.C. (20)
Dunbar, J.C. (8)
Duran Garcia, S. (15)

E

Eaton, R.P. (57)
Eisenthal, r. (165)
Ellis, D.J. (170)
Eng, J. (132)

F

Fabrykant, M (25), (26), (27)
Fargue, M.E. (90)
Feldmann, J.M (19)
Flier, J.S. (114)
Fotino, M. (150)
Franckson, J.R.M. (23), (24)
Freemann, C. (105)
Freychet, P. (47), (86), (87), (88), (95), (96), (99)

G

Gambhir, K.K.	(68),	(69)		
Gammeltoft, S.	(140)			
Gavin III., J.R.	(52),	(125)		
Gibbons, J.D.	(177)			
Gliemann, J.	(48),	(49),	(83),	(94), 141)
Goldfine, I.D.	(92),	(106)		
Gorden, P.H.	(39),	(43)		
Grodsky, G.M.	(6)			

H

Hamelbeck, H.	(32)
Hellmann, B.	(5)
Hepp, K.D.	(108)
Holle, A.	(36)

I

Immich, H.	(174)
Insel, J.R.	(147)
Ip, C.	(131)

J

Joergensen, C.	(182)
----------------	-------

K

Kahn, C.R.	(44), (81), (98), (101), (115), (123), (129)
Kalk, W.J.	(18)
Katzen, H.M.	(76)
Klotz, I.M.	(156), (171)
Knick, B.	(30), (59)
Kobayashi, M.	(117), (122)
Kolb, H.J.	(75)
Kono, T.	(46)
Kosmakos, F.C.	(133)
Künzi, H.P.	(180)

L

Lacher, F.	(187)
Lebovitz, H.E.	(11), (22)
Lefkowitz, R.J.	(78), (79)
Lesniak, M.A.	(167)
Levey, G.S.	(21), (82)
Levine, R.	(72)
Levy, J.	(14)
Lin, W.-Y.	(80)
Lineweaver, H.	(160)
Linke, A.	(28)
Loubatieres, A.L.	(4)

M

Marco, J. (17)
Marinetti, G.V. (169)
Mehnert, H. (60), (61) (148)
Mendenhall, W. (175)
Marimee, T.J. (135)
Misbin, R.I. (126)
Monot, C. (181)
Moore, G.E. (151)
Muggeo, M. (139), (142)

N

Netter, H. (154)

O

Olefsky, J.M. (33), (34), (35), (55), (65), (66)
(103), (104), (107), (110), (112),
(130)
Oxid, S. (121)

P

Pastan, I. (73)
Pedersen, O. (113)
Pek, S. (16)
Pezzino, V. (56)
Pfeiffer, E.F. (2)

QR

Reaven, G.M. (37)
Robinson, T.J. (70)
Rosselin, G. (93)
Roth, J. (51), (97)

S

Sachse, G. (185)
Sauer, H. (186)
Scatchard, G. (157)
Schatz, H. (13)
Schauder, P. (9), (10)
Schild, H.O. (159)
Schilling, E.E. (118)
Schlessinger, J. (42)
Schwartz, R.H. (143)
Scott, R.L. (161)
Simon, H. (179)
Simon, J. (89)
Sodoyez, J.-C. (7)
Soll, A.H. (64), (100), (102)
Somon, V.R. (127), (128)
Stratmann, F.W. (29)

T

Tanese, T.	(12)
Taylor, S.I.	(119)
Thompson, c.J.	(158)
Trautmann, K.J.	(58)

U, V, W

Wachslicht-Rodbard, H.	(120)
Weder, H.G.	(172)

X, Y, Z

Yalow, R.S.	(3), (50)
-------------	-----------

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Bachmann, der die vorliegende Studie angeregt hat und der mir mit zahlreichen Ratschlägen bei der Durchführung zur Seite stand.

Den Herren Prof. Dr. H. Mehnert und Prof. Dr. O. Wieland, den Leitern der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing und der Forschergruppe Diabetes danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrer Klinik und an ihrem Institut durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. N. Lotz, der als Stationsarzt mich bei der Auswahl der Untersuchungspersonen ganz wesentlich unterstützte und der mir half die diversen Blutabnahmen und klinischen Laboruntersuchungen sicherzustellen.

Herrn Dr. med. F. Lacher, der zur gleichen Zeit an seiner Dissertation arbeitete, danke ich ganz herzlich für seine stete Bereitschaft zur Kritik und Diskussion sowie für seine vielen Verbesserungsvorschläge.

Zu ganz besonderem Dank bin ich der physikalisch-technischen Assistentin Frl. E. Schäffer verpflichtet, die bei der Anfertigung der Zeichnungen und der Photographien mit nie nachlassender Sorgfalt eine unersetzliche Hilfe gewesen ist.

Außerdem möchte ich mich noch bei den med.-techn. Assistentinnen G. Krug und J. Mushack für ihre vielfältige Hilfe bei der Durchführung der biochemischen Arbeiten herzlich bedanken.

Lebenslauf

- 14.09.47 Geboren in Ludwigsburg als Sohn des
Rechtsanwalts Prof. Dr. jur. Ferdinand
Sieger und seiner Frau Christine, geb.
Purrmann
- 1954 - 1966 Besuch der Grundschule in Stuttgart
- 1958 - 1966 Besuch des humanistischen Zweiges des
Eberhard-Ludwigs-Gymnasiums in Stuttgart
- 14.06.66 Abitur
- 01.01.67 -
01.04.68 Wehrdienst bei der Bundesmarine
- 1968 - 1974 Ab Sommersemester 1968 Physikstudium an
der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 15.11.74 Diplom in Physik der Universität München
- ab 01.01.75 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut
für med. Optik der Universität München
- 21.07.80 Promotion zum Dr. rer. nat.: Thema der
Dissertation: "Fourieranalyse von Schwin-
gungen mittels zeitlich modulierter Ho-
lographie am Modell des menschlichen Trom-
melfells"
- 1976 - 1981 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an
der Ludwig-Maximilians- Universität,
München
- 31.08.76 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in
München
- 21.08.81 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in
München
- 1980 - 1982 Mitarbeit innerhalb der Forschergruppe Dia-
betes am Krankenhaus München-Schwabing
(Leiter: Prof. H. Mehnert/ Prof. O. Wieland)
unter PD Dr. W. Bachmann
- 12.11.82 Praktische Ausbildung (PJ) an der Chirugi-
schen Poliklinik, an der 1. Frauenklinik so-
wie am Städtischen Krankenhaus München-
Schwabing
- 17.01.83 Approbation als Arzt
- ab 1.1.83 Leiter der Medizinischen Abteilung der Arz-
neimittelfirma Zyma GmbH, München

